

---

**Zu Komplex I verwandte Hydrogenasen in**  
***Carboxydotherrnus hydrogenoforrans* und**  
***Therrnoanaerobacter tengcongensis***

**DISSERTATION**

Zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Basem Soboh**  
aus Palästina/Gaza

Marburg/Lahn im Mai 2004

---

Die während der Promotion erzielten Ergebnisse sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

**Soboh, B., Linder, D. & Hedderich, R. (2002).** Purification and catalytic properties of a CO-oxidizing:H<sub>2</sub>-evolving enzyme complex from *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5712-5721.

**Soboh, B., Linder, D. & Hedderich, R. (2004)** A multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase and a NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis*. Microbiology, Zur Publikation angenommen

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Acetyl-P	Acetyl-Phosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BV	Benzylviologen
<i>Ca. hydrogenoformans</i>	<i>Carboxydotherrnus hydrogenoformans</i>
CoA	Coenzym A
CO-DH	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
DCCD	<i>N,N'</i> -Dicyclohexyl-Carbodiimid
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient ( $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
$E^\circ$	Standardredoxpotential
Ech	energy converting hydrogenase
EPR	Elektronen paramagnetische Resonanz
Fd	Ferredoxin
$\Delta G^\circ$	Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen bei pH 7
[H]	Reduktionsäquivalent
k.A.	keine Angabe
MALDI-TOF-MS	Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry
MB	Methylenblau
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
<i>Ms. barkeri</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MTZ	Metronidazol
MV	Methylviologen
$\Delta \text{OD}_{578}$	Änderung der Optischen Dichte einer Bakterienkultur bei 578 nm
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>Ta. tengcongensis</i>	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>Tt. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
U	Unit, 1unit = $1 \mu\text{mol min}^{-1}$
Upm	Umdrehungen pro Minute

## I ZUSAMMENFASSUNG

Die Fähigkeit, Kohlenmonoxid unter anaeroben Bedingungen als Energiesubstrat zu nutzen, ist auf wenige Mikroorganismen beschränkt. Hierzu zählt das Gram-positive thermophile Bakterium *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. Die aus der Oxidation von Kohlenmonoxid stammenden Elektronen werden in diesem Organismus auf Protonen unter Bildung von Wasserstoff übertragen.



Aus der Membranfraktion dieses Bakteriums wurde nach Solubilisierung mit dem Detergens Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid ein Enzymkomplex, der als CO-oxidierender/H<sub>2</sub>-bildender Enzymkomplex bezeichnet wurde, gereinigt und charakterisiert. Mit 5% CO in der Gasphase katalysierte der Enzymkomplex die Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> mit einer spezifischen Aktivität von etwa 450 U (mg Protein)<sup>-1</sup>. Höhere CO-Konzentrationen in der Gasphase führten zur Hemmung der Hydrogenase im Enzymkomplex. Der Enzymkomplex konnte sowohl mit CO als auch mit einem starken Reduktionsmittel aktiviert werden.

Der gereinigte Enzymkomplex bestand aus acht Untereinheiten, sechs hydrophilen und zwei hydrophoben Polypeptiden. Nach Bestimmung der aminoterminalen Sequenzen konnten die kodierenden Gene, die in zwei direkt aufeinander folgenden Genclustern lokalisiert sind, im vollständig sequenzierten Genom von *Ca. hydrogenoformans* identifiziert werden.

Die biochemische Charakterisierung des Enzymkomplexes und eine Sequenzanalyse der Untereinheiten zeigten, dass der Enzymkomplex aus einer Ni-haltigen Kohlenmonoxid-Dehydrogenase und einer membranständigen [NiFe]-Hydrogenase zusammengesetzt ist. Die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase besteht aus der katalytischen Untereinheit CooS und dem Elektronentransferprotein (Polyferredoxin) CooF. Die Hydrogenase setzt sich aus vier hydrophilen Proteinen und zwei integralen Membranproteinen zusammen. Diese besitzen eine hohe Sequenzverwandtschaft zu den korrespondierenden Untereinheiten einer zu Komplex I verwandten Gruppe von [NiFe]-Hydrogenasen. Da *Ca. hydrogenoformans* mit CO als alleinigem Energiesubstrat wachsen kann, muss die Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> mit einer Energiekonservierung gekoppelt sein. Es wird angenommen, dass die

Hydrogenase in dem Enzymkomplex ähnlich wie Komplex I als Ionenpumpe ( $H^+$  oder  $Na^+$ ) fungiert.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit zielte auf die Charakterisierung der Hydrogenasen in *Ta. tengcongensis*, einem thermophilen Gram-positives Bakterium, das Stärke oder Glukose zu Acetat, Ethanol,  $CO_2$  und  $H_2$  fermentiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Organismus eine einzigartige Kombination von zwei Hydrogenasen besitzt, die die Bildung von  $H_2$  während der Fermentation katalysieren. Beide Enzyme, eine Ferredoxin-abhängige membrangebundene-[NiFe]-Hydrogenase und eine heterotetramäre NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase, wurden gereinigt und charakterisiert. Die membrangebundene Hydrogenase gehört ebenso wie die Hydrogenase aus *C. hydrogenogformans* zu einer Gruppe von zu Komplex I verwandten [NiFe]-Hydrogenasen. Als physiologisches Substrat dieser Hydrogenase konnte ein Ferredoxin identifiziert werden. Dieses Enzym katalysiert die  $H_2$ -Bildung mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator mit einer spezifischen Rate von  $38 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ .

Die aus der löslichen Fraktion von *Ta. tengcongensis* gereinigte Hydrogenase enthält FMN, mehrere Eisen-Schwefel-Zentren und zeigt im oxidierten Zustand ein EPR-Signal, das charakteristisch für das im aktiven Zentrum von [FeFe]-Hydrogenasen lokalisierte H-Cluster ist. Die biochemische Charakterisierung und Sequenzanalyse der Untereinheiten dieses Enzyms zeigten, dass es sich bei diesem Enzym um eine NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase handelt.

Wurde der  $H_2$ -Partialdruck ( $p(H_2)$ ) in *Ta. Tengcongensis*-Kulturen durch Begasung des Fermenters mit  $N_2$  niedrig gehalten, wurde 1 mol Glucose zu 2 mol Acetat, 2 mol  $CO_2$  und 4 mol  $H_2$  umgesetzt. Wenn hingegen  $H_2$  in den Kulturen akkumulierte (Zucht in geschlossenen Flaschen), wurde die Fermentation teilweise in Richtung Ethanolbildung verschoben. Während die spezifische Aktivität der Ferredoxin-abhängigen [NiFe]-Hydrogenase nicht durch die Wachstumsbedingungen beeinflusst wurde, war die NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase-Aktivität etwa 4-fach höher in Zellextrakten aus Fermenter-Kulturen (niedriger  $p(H_2)$ ). Alkohol-Dehydrogenase- und Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten waren hingegen etwa 5fach höher in Zellextrakten aus Flaschenkulturen (hoher  $p(H_2)$ ). Dies deutet auf eine Regulation in Abhängigkeit von  $p(H_2)$  hin.

## II EINLEITUNG

Hydrogenasen sind die Schlüsselenzyme bei der Umsetzung von Wasserstoff in Lebewesen. Genau genommen beschreibt die Bezeichnung HYDROGENASEN eine große Klasse von Enzymen, die im nächsten Abschnitt näher vorgestellt werden. Hydrogenasen erfüllen in zahlreichen prokaryontischen Organismen mit Wasserstoff-Metabolismus wichtige Funktionen im Energiehaushalt (Schwarz & Friedrich, 2003).

Viele Organismen können Wasserstoff produzieren. Meistens entsteht Wasserstoff infolge der Vergärung von organischen Makromolekülen (z.B. Kohlenhydraten). Bei einer Vielzahl fermentativer Mikroorganismen findet der Wasserstoffmetabolismus nur unter Sauerstoffausschluss statt. In solchen obligat oder fakultativ anaeroben Bakterien werden die in fermentativen Stoffwechselprozessen anfallenden Reduktionsäquivalente durch Oxidation regeneriert, wobei überschüssige Reduktionsäquivalente durch Hydrogenasen auf Protonen als alleinige Elektronenakzeptoren übertragen werden. Beispiele hierfür sind Arten der Gattungen *Clostridium*, *Thermotoga* und *Escherichia*, auf die später detailliert eingegangen wird. Andererseits erlaubt die durch Hydrogenase katalysierte Reaktion die Nutzung von molekularem Wasserstoff als alleinigen Elektronendonator zur Reduktion der terminalen Elektronenakzeptoren wie z.B. Nitrat, Fumarat, Sulfat oder Kohlendioxid (z.B. *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Desulfovibrio* und *Methanobacterium*). Dabei sind die meist membrangebundenen Hydrogenasen Bestandteil einer energiekonservierenden Atmungskette.

Hydrogenasen katalysieren sowohl die oxidative Spaltung von molekularem Wasserstoff zu Protonen und Elektronen als auch die reduktive Bildung von Wasserstoff aus Protonen:



*In vivo* katalysieren Hydrogenasen meist nur eine Richtung der Reaktion. Obwohl Hydrogenasen die chemisch denkbar einfachste Reaktion, reversible Oxidation von Wasserstoff zu Protonen katalysieren, handelt es sich bei ihnen um eine eher heterogene Klasse von Enzymen, die sich hinsichtlich ihrer molekularen Massen, Zusammensetzung

ihrer Untereinheiten, Spezifität gegenüber unterschiedlichen physiologischen Elektronendonatoren und -akzeptoren, Metallgehalt, Cofaktoren, spezifischen Aktivitäten und Empfindlichkeit gegenüber molekularem Sauerstoff erheblich unterscheiden. Gemeinsam haben die Hydrogenasen jedoch, dass es sich bei ihnen um [Fe-S]-Proteine handelt. Eine Ausnahme stellt die wasserstoffbildende Methylenetetrahydromethanopterin-Dehydrogenase in methanogenen Archaeobakterien dar, die kein [Fe-S]-Cluster enthält.

### **Einteilung, Struktur und Katalysemechanismus von Hydrogenasen**

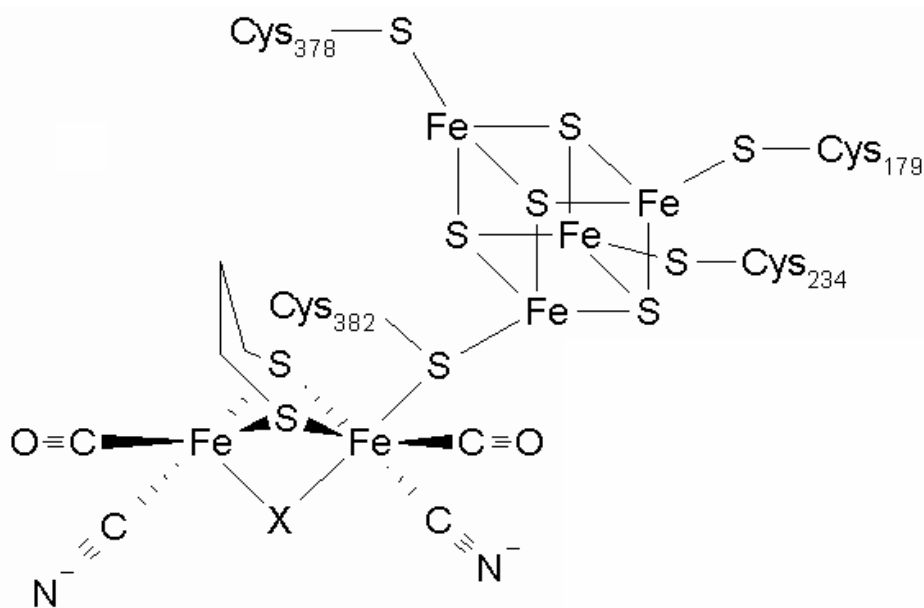
Die Hydrogenasen prokaryontischer Organismen sind seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Sie sind hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften und ihrer Struktur z.T. gut charakterisiert (zur Übersicht: (Cammack, 1999; Frey, 1998; Friedrich & Schwartz, 1993; Przybyla et al., 1992; Schwarz & Friedrich, 2003; Vignais et al., 2001; Wu & Mandrand, 1993). Im folgenden sind die bekannten Hydrogenasen nach dem Metallgehalt in ihrem aktiven Zentrum gegliedert.

#### **[FeFe]-Hydrogenasen**

Im aktiven Zentrum dieser Hydrogenasen finden sich nur Eisenionen und säurelabiler anorganischer Schwefel in Form von Sulfid. Alle Hydrogenasen dieses Typs sind extrem sauerstoffempfindlich, weisen *in vitro* die höchsten Aktivitäten auf und enthalten mindestens ein [4Fe-4S]-Cluster vom Ferredoxintyp. Sie werden als [FeFe]-Hydrogenasen oder auch als „Fe-only“-Hydrogenasen bezeichnet. Es handelt es sich bei ihnen meist um monomere, cytoplasmatische Enzyme, die überwiegend in strikt anaeroben Bakterien die Entwicklung von Wasserstoff mit der Oxidation von Reduktionsäquivalenten im Zuge ihres fermentativen Stoffwechsels koppeln (Holtz et al., 1991). Aber auch in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Happe et al., 1994) sowie in den Trichomonaden *Trichomonas vaginalis* (Payne et al., 1993) und dem Ciliaten *Nyctotherus ovalis* (Akhmanova et al., 1998) wurden [FeFe]-Hydrogenasen identifiziert.

Erst in den vergangenen Jahren konnten die Kristallstrukturen der [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* (Peters et al., 1998) und *Desulfovibrio desulfuricans* (Nicolet et

al., 1999) aufgeklärt werden. Die Strukturen lassen sowohl Kanäle für Protonen als auch für Wasserstoff erkennen, die das aktive Zentrum mit der Proteinoberfläche verbinden. Der Elektronenaustausch findet über [4Fe-4S]-Cluster statt. Das aktive Zentrum besteht aus einem sogenannten H-Cluster (**Abb. 1**). Dieser setzt sich aus 6 Eisenatomen zusammen, von denen 4 in einem [4Fe-4S]-Cluster arrangiert sind. Die beiden übrigen Eisenatome bilden ein binukleares Zentrum, das über einen Cysteinrest mit dem [4Fe-4S]-Zentrum verbunden ist. Beide Eisenatome tragen jeweils einen Kohlenmonoxid- und einen Cyanid-Liganden (Pierik et al., 1998; Pierik et al., 1998).



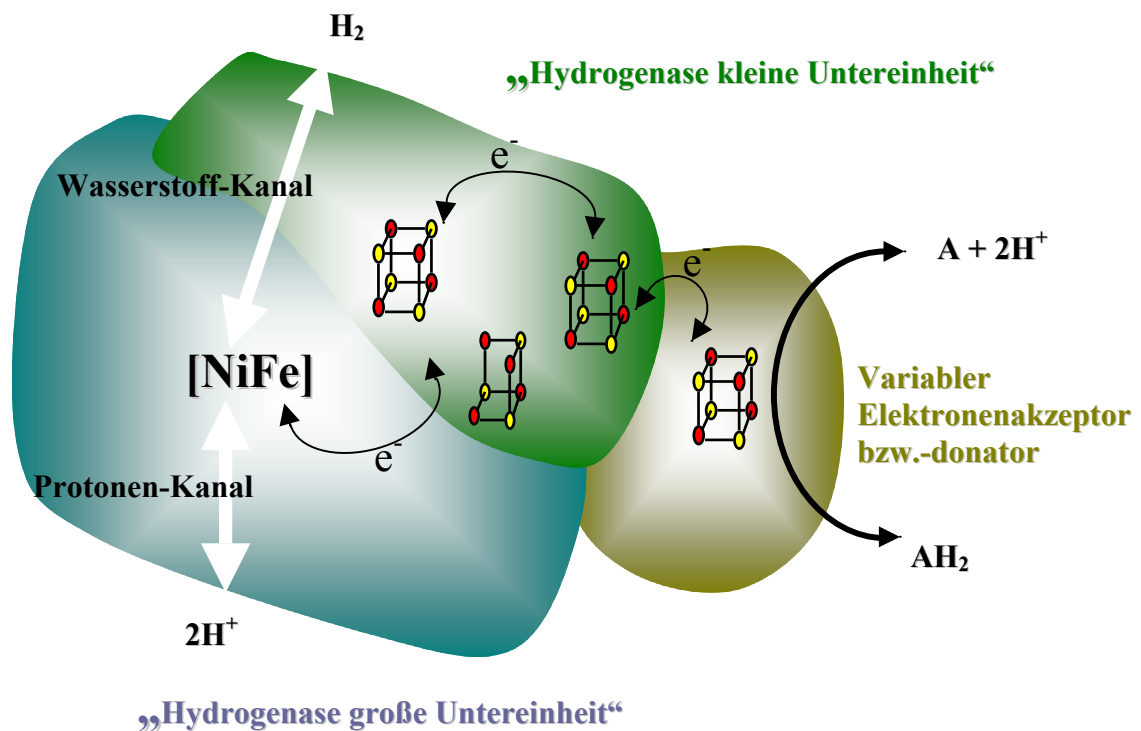
**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Struktur der aktiven Zentren (H-Cluster) der [FeFe]-Hydrogenasen aus *Desulfovibrio desulfuricans* (Nicolet et al., 1999)

### [NiFe]-Hydrogenasen

Bis heute sind erst 8 Enzyme bekannt, die Nickel in ihrem aktiven Zentrum enthalten: Urease, [NiFe]-Hydrogenasen, Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase, Methyl-Coenzym-M-Reduktase, Ni-Superoxid-Dismutase, Glyoxalase I und Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (SlyD) aus *Escherichia coli* (Watt & Ludden, 1998).



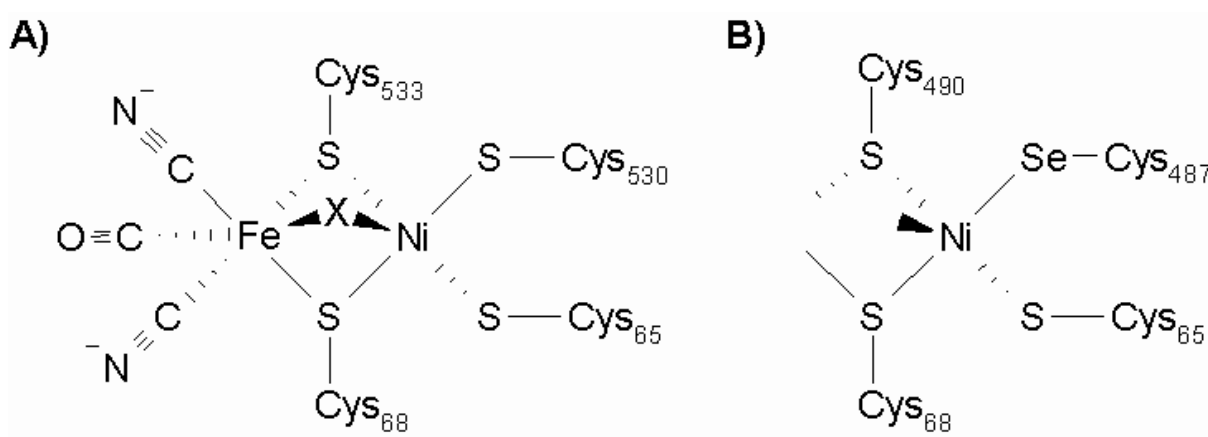
Im aktiven Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen finden sich neben Eisen-Ionen und säurelabilem anorganischem Schwefel auch Nickel-Ionen, wie erstmals von Graf und Thauer (Graf & Thauer, 1981) nachgewiesen werden konnte. [NiFe]-Hydrogenasen sind die am weitesten verbreiteten Hydrogenasen. Innerhalb dieser Enzyme sind zwei Untereinheiten hoch konserviert: Eine große Untereinheit mit molekularen Massen von 49 bis 86 kDa und einer kleinen Untereinheit mit molekularen Massen von 15 bis 45 kDa. Die große Untereinheit dient dabei der Bindung des Nickels und der Wasserstoffaktivierung, während die kleine Untereinheit den Elektronentransfer vom oder zum katalytischen Zentrum übernimmt. Die meisten Enzyme enthalten ein bis zwei weitere nicht-konservierte Untereinheiten, die mit dem jeweiligen physiologischen Elektronendonator bzw. -akzeptor interagieren (Schwarz & Friedrich, 2003) (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* nach der von Volbeda et al (Volbeda et al., 1995) aufgelösten Kristallstruktur. Das [3Fe-4S]-Cluster ist wahrscheinlich nicht am Elektronentransfer beteiligt (Garcin et al., 1998).

Die [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas*, deren Kristallstruktur Mitte der 90er Jahre als erstes gelöst wurde, ist ein typischer Vertreter dieser Gruppe von Enzymen

(Volbeda et al., 1995), die im folgenden als **Standard-[NiFe]-Hydrogenasen** bezeichnet werden, zur Abgrenzung von den in dieser Arbeit näher beschriebenen Energie-konvertierenden [NiFe]-Hydrogenasen. Das aktive Zentrum der Standard-[NiFe]-Hydrogenasen aus *Desulfovibrio gigas* ist in der großen Untereinheit lokalisiert und enthält neben Nickel noch ein Eisenatom (Garcin et al., 1999). (Abb. 3) zeigt den Aufbau des aktiven Zentrums. Das Nickelatom ist über vier Cysteine quadratisch-pyramidal koordiniert. Zwei Cystein-Reste dienen als Brückenliganden zwischen Nickel und Eisen, woraus ein Metall-Metall-Abstand von 2,8 Angström resultiert. Das Eisen ist oktaedrisch gebunden. Die drei diatomaren Liganden konnten als 2 Cyanide und ein Kohlenmonoxidmolekül identifiziert werden (Happe et al., 1997; Pierik et al., 1999; Volbeda et al., 1996).



**Abb. 3:** Schematischer Aufbau des aktiven Zentrums A) der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* nach der von Volbeda *et al.* (Volbeda et al., 1995) aufgelösten Kristallstruktur und B) der [NiFeSe]-Hydrogenase aus *Desulfomicrobium baculatum* (Garcin et al., 1999). X steht für einen, die beiden Metallatome verbrückenden Liganden, bei dem es sich je nach Zustand des Enzyms um OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub> oder H<sup>+</sup> handeln kann (Stein & Lubitz, 2002). In B) sind nur die Liganden um das Ni-Atom eingezeichnet.

### [NiFeSe]-Hydrogenasen

Neben Eisen-Ionen, Nickel-Ionen und säurelabilem Schwefel konnte Selen im aktiven Zentrum von einigen Hydrogenasen nachgewiesen werden. Dieser Enzymtyp findet sich in sulfatreduzierenden (Rieder et al., 1984; Teixeira et al., 1987; Teixeira et al., 1986;

Teixeira et al., 1990) und methanogenen Archaea (Sorgenfrei et al., 1996; Yamazaki, 1982). Sie können als eine Untergruppe der [NiFe]-Hydrogenasen angesehen werden. Ein Nickel koordinierendes Cystein (**Abb. 3**) wird in diesen Enzymen durch Selenocystein substituiert, bei dem der Schwefel durch Selen ersetzt ist (Garcin et al., 1999). Die Funktion des Selens als Ligand des Nickels im aktiven Zentrum dieser Hydrogenasen ist noch nicht geklärt. Selen und Schwefel haben ähnliche chemische Eigenschaften und es ist bereits von anderen pro- und eukaryontischen Enzymen wie der Glutathion-Peroxidase (Chambers et al., 1986) und der Formiat-Dehydrogenase (Axley et al., 1990) bekannt, dass Selen als Ligand von Metallzentren an Redoxreaktionen beteiligt ist. Als mögliche Funktion des Selens in Hydrogenasen wird eine Modulation der katalytischen Aktivität diskutiert.

### **[FeS]-Cluster freie Hydrogenasen**

Aus dem methanogenen Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* konnte neben 4 unterschiedlichen [NiFe]-Hydrogenasen (Tersteegen & Hedderich, 1999) auch ein [FeS]-Cluster freies, wasserstoffumsetzendes Enzym identifiziert und charakterisiert werden (Afting et al., 1998; Buurman et al., 2000; Thauer et al., 1996). Es handelt sich dabei um die wasserstoffbildende Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Hmd). Dieses Enzym enthält kein redox-aktives Metallzentrum. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Enzym einen Fe-haltigen Cofaktor enthält (Buurman et al., 2000; Lyon et al., 2004). Interessanterweise trägt das Eisen in Hmd ebenfalls CO Liganden (Erika Lyon, persönliche Mitteilung).

### **Energiekonvertierende [NiFe]-Hydrogenasen**

In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Bakterien und Archaea membrangebundene [NiFe]-Hydrogenasen identifiziert und näher charakterisiert, die sich sowohl in ihrem molekularen Aufbau als auch in ihrer Primärstruktur deutlich von Standard-[NiFe]-Hydrogenasen unterscheiden (Hedderich, 2003). Auch diese membrangebundenen Hydrogenasen tragen das Basismodul aller [NiFe]-Hydrogenasen. Die Sequenzverwandtschaft zu den korrespondierenden Untereinheiten der [NiFe]-

Hydrogenasen ist allerdings sehr gering. Vertreter dieser kleinen Gruppe membrangebundener Hydrogenasen sind Hydrogenase 3 aus *Escherichia coli* (Hyc) (Böhm et al., 1990; Sauter et al., 1992), Ech-Hydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* (Küinkel et al., 1998; Meuer et al., 1999) und CO-induzierte Hydrogenase (Coo) aus *Rhodospirillum rubrum* (Fox et al., 1996) (**Abb. 4**). Innerhalb dieser Enzyme sind sechs Untereinheiten, zwei integrale Membranproteine und vier hydrophile Polypeptide konserviert. Durch Sequenzanalysen konnten zwei der Polypeptide als Hydrogenase „große“ und „kleine“ Untereinheit identifiziert werden, wie sie in allen [NiFe]-Hydrogenasen gefunden werden. Die Hydrogenase große Untereinheit enthält vier hoch konservierte Cysteinreste, die als Liganden für das binukleäre [NiFe]-Zentrum fungieren. Die Hydrogenase kleine Untereinheit dieser membrangebundenen Hydrogenasen ist kleiner als die anderer [NiFe]-Hydrogenasen und enthält nur die Cystein-Liganden für ein einziges, das sogenannte proximale [4Fe-4S]-Zentrum. Diese beiden Hydrogenase-Untereinheiten zeigen eine deutlich höhere Sequenzverwandtschaft zu Untereinheiten der Protonen- oder Natriumionen-pumpenden NADH:Chinon-Oxidoreduktasen, auch als „Komplex I“ bezeichnet, aus Eubakterien, Mitochondrien und Chloroplasten (Böhm et al., 1990; Küinkel et al., 1998; Friedrich & Scheide, 2000; Sauter et al., 1992). Die dritte hydrophile Untereinheit dieser membrangebundenen Hydrogenasen enthält Bindemotive für zwei [4Fe-4S]-Zentren. Zu dieser wie auch zu den beiden membranintegralen Untereinheiten finden sich ebenfalls homologe Proteine in Komplex I. Somit besitzen die sechs in diesen Hydrogenasen konservierten Untereinheiten eine ausgeprägte Sequenzverwandtschaft zu Untereinheiten der Energie-konservierenden NADH:Quinon-Oxidoreduktasen (**Abb. 5**).

Einige Vertreter dieser Enzymfamilie membrangebundener [NiFe]-Hydrogenasen besitzen eine deutlich komplexere Untereinheiten-Zusammensetzung mit bis zu 20 vorhergesagten Untereinheiten. Hierzu gehören die Hydrogenasen Eha und Ehb aus *Methanothermobacter marburgensis* (Tersteegen & Hedderich, 1999), Hydrogenase 4 aus *Escherichia coli* (Hyf) (Andrews et al., 1997) sowie Mbh-Hydrogenase aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* (Silva et al., 2000). Keines dieser Enzyme konnte jedoch bisher gereinigt werden.

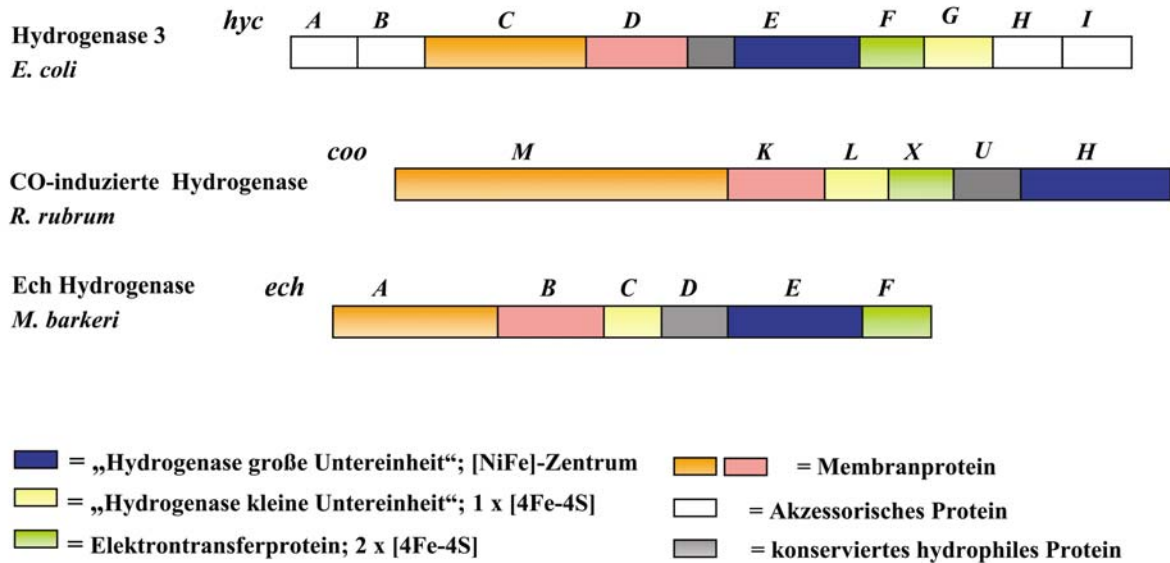


Abb. 4: Organisation der Gencluster verschiedener Energie-konvertierender [NiFe]-Hydrogenasen und Eigenschaften der abgeleiteten Proteine. Sequenzverwandte Untereinheiten sind in gleichen Farben dargestellt.

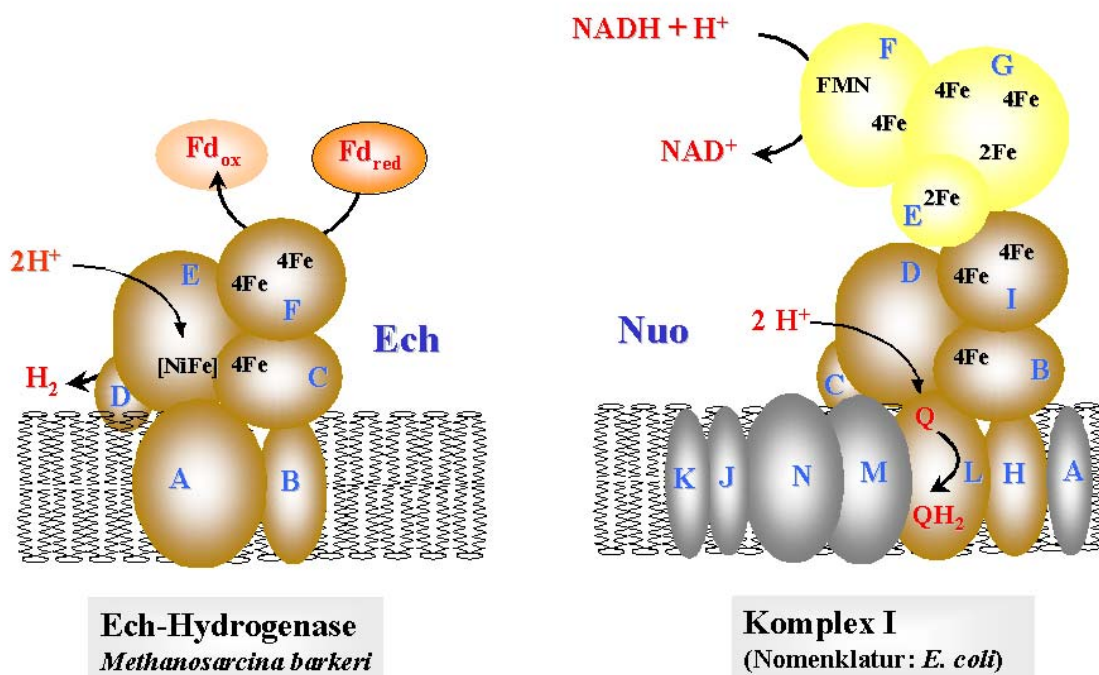
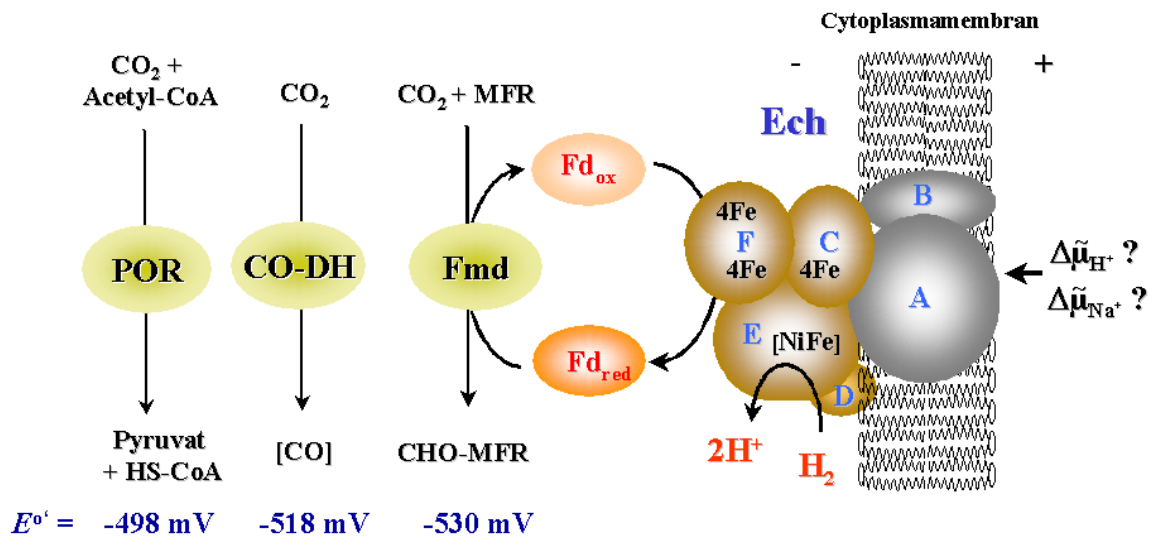


Abb. 5: Modell zum Aufbau von Ech-Hydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* im Vergleich zu NADH:Quinon-Oxidoreduktase (Komplex I). Als Beispiel ist das Enzym aus *Escherichia coli* gezeigt. Homologe Untereinheiten sind in gleichen Farben dargestellt. [NiFe]: Nickel-Eisen-Zentrum, 4Fe: [4Fe-4S]-Zentrum, 2Fe: [2Fe-2S]-Zentrum, Q: Ubichinon oder Menachinon, Fd: Ferredoxin.

Die enge Verwandtschaft zwischen den membrangebundenen Hydrogenasen und Komplex I lässt auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung dieser Enzyme schließen, woraus sich die Frage nach möglichen funktionellen Gemeinsamkeiten zwischen diesen Enzymen ergibt. Handelt es sich bei den membrangebundenen Hydrogenasen ebenfalls um Ionenpumpen ? Diese Frage soll im folgenden für CO-induzierte Hydrogenase aus *R. rubrum*, Hydrogenase-3 aus *E. coli* und Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* diskutiert werden.

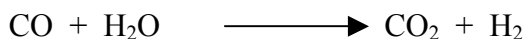
In den letzten Jahren gelang die Isolierung und Charakterisierung von Ech-Hydrogenase (energy converting hydrogenase) aus *Ms. barkeri* als erstem Vertreter dieser zu Komplex I verwandten [NiFe]-Hydrogenasen. Als Substrat dieses Enzyms fungiert ein aus *Ms. barkeri* isoliertes [4Fe-4S]-Ferredoxin (Künkel et al., 1998; Meuer et al., 1999). Um die Frage der physiologischen Bedeutung des Enzyms aufzuklären, wurde eine *ech*-Deletionsmutante hergestellt und physiologisch charakterisiert (Meuer et al., 2002). *Ms. barkeri* besitzt die Fähigkeit, unterschiedliche Energiesubstrate zu nutzen. Der Organismus kann unter anderem  $H_2/CO_2$  zu Methan umsetzen, Methanol zu Methan und  $CO_2$  disproportionieren, Acetat zu Methan und  $CO_2$  umsetzen oder Methanol durch  $H_2$  zu Methan reduzieren. Die  $\Delta ech$ -Mutante wächst mit Methanol als alleinigem Energiesubstrat mit gleichen Raten wie der Wildtyp. Die Mutante ist nicht mehr in der Lage,  $H_2/CO_2$  oder Acetat als alleinige Energiesubstrate zu nutzen. Auch mit Methanol/ $H_2$  ist kein Wachstum zu beobachten. Dieses kann jedoch durch Zugabe von Pyruvat, dem zentralen Intermediat des Baustoffwechsels, wieder hergestellt werden. Durch die Charakterisierung der mit Methanol kultivierten  $\Delta ech$ -Mutante und dem Vergleich mit dem Wild-Typ konnte nachgewiesen werden, welche Schritte in der Mutante blockiert sind. Die Ech-Mutante katalysiert einige Redoxreaktionen nicht mehr, die mit  $H_2$  als Elektronendonator endergon sind. Hierzu zählt die reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Pyruvat, die Reduktion von  $CO_2$  zu Enzym-gebundenem CO bei der Acetyl-CoA-Synthase und der einleitende Schritt der Methanogenese aus  $CO_2$  und  $H_2$ , die Reduktion von  $CO_2$  und Methanofuran (MFR<sup>+</sup>) zu Formylmethanofuran (CHO-MFR).



**Abb. 6: Vorgeschlagene Funktion von Ech-Hydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* in endergonen Redoxreaktionen.** Ech: Ech-Hydrogenase, POR: Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Fmd: Formylmethanofuran-Dehydrogenase, CO-DH: Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase-Komplex, Fd: Ferredoxin, [NiFe]: Nickel-Eisen-Zentrum, 4Fe: [4Fe-4S]-Zentrum, MFR: Methanofuran, CHO-MFR: Formylmethanofuran.

Untersuchungen an intakten Zellen hatten bereits zuvor gezeigt, dass diese Reaktionen durch revertierten Elektronentransport getrieben werden (Kaesler & Schönheit, 1989; Kaesler & Schönheit, 1989; Winner & Gottschalk, 1989). Diese Daten führten zum in (Abb. 6) dargestellten Modell zur Funktion von Ech-Hydrogenase (Meuer et al., 2002). Nach diesem Modell katalysiert das Enzym die Reduktion von Ferredoxin durch H<sub>2</sub>. Diese endergone Reaktion wird durch revertierten Elektronentransport ermöglicht. Reduziertes Ferredoxin steht als Elektronendonator verschiedener Oxidoreduktasen zur Verfügung, die Reduktionsäquivalente mit niedrigem Redoxpotenzial benötigen. Bei Wachstum mit Acetat als alleinigem Energiesubstrat besitzt das Enzym dagegen eine andere Funktion. Hier katalysiert es die H<sub>2</sub>-Bildung mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator. In diesem Stoffwechselweg wird reduziert Ferredoxin bei der Oxidation der Carbonylgruppe des Acetats zu CO<sub>2</sub> gebildet. Diese Teilreaktion, die Umsetzung von Acetat zu CO<sub>2</sub> und Methan, ähnelt stark der nachfolgend beschriebenen Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> durch *R. rubrum* und *Ca. hydrogeniformans*.

Weitere Mitglieder dieser Hydrogenase-Familie finden sich in Organismen, die Kohlenmonoxid unter anaeroben Bedingungen als Energiesubstrat nutzen.



Hierzu zählen die phototrophen Bakterien *Rhodospirillum rubrum* und *Rubrivax gelatinosus* (früher *Rhodopseudomonas gelatinosus*) (Kerby et al., 1997; Uffen, 1976; Uffen, 1983) sowie das Gram-positive Bakterium *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* (Kerby et al., 1992; Svetlichny et al., 1999) Biochemische Untersuchungen zur Umsetzung von CO lagen zunächst nur für *R. rubrum* vor. Bei Wachstum mit CO als alleinigem Energiesubstrat werden in diesem Organismus eine CO-Dehydrogenase und eine Hydrogenase (= CO-induzierte Hydrogenase) gebildet, die für die Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> essentiell sind. Kohlenmonoxid-Dehydrogenase ist ein Nickel-Eisen-Schwefel-Protein. Das gereinigte Enzym besteht aus nur einer Untereinheit (CooS) (Bonam et al 1987; Svetlichny et al., 1991). Die Kristallstruktur des Enzyms zeigt, dass das Enzym als Homodimer mit 5 Metallzentren vorliegt (Drennan et al., 2001). Cluster C ist ein [Ni-Fe-S]-Zentrum, das das aktive Zentrum des Enzyms bildet. Cluster B ist ein konventionelles [4Fe-4S]-Zentrum. Cluster B und C liegen zweimal pro Homodimer vor. Cluster D ist ein [4Fe-4S]-Zentrum, das die beiden Untereinheiten des Enzyms verbrückt und nur einmal pro Homodimer vorliegt. Das Gen *cooS*, das für die CO-Dehydrogenase kodiert, liegt mit den Genen *cooFCTJ* in einer Transkriptionseinheit vor (He et al., 1996). *cooF* kodiert für ein 21 kDa Elektronentransfer-Protein mit vier Bindemotiven für [4Fe-4S]-Zentren (Ensign & Ludden, 1991; Kerby et al., 1992). Unter bestimmten Reinigungsbedingungen wurde die CO-Dehydrogenase (CooS) zusammen mit dem Elektronentransfer-Protein CooF gereinigt (Ensign & Ludden, 1991). CooF fungiert als Elektronenüberträger zwischen CO-Dehydrogenase und der Hydrogenase (siehe unten). Die Genprodukte von *cooCTJ* katalysieren die Insertion von Ni in CO-Dehydrogenase (Kerby et al., 1997).

Die Hydrogenase aus *R. rubrum*, deren Bildung bei Wachstum auf CO induziert wird, wird durch ein separates Operon kodiert. Das Operon besteht aus den sechs Genen *cooMKLXUH* (Fox et al., 1996; Fox et al., 1996). Die Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> in *R. rubrum* muss mit Energiekonservierung gekoppelt sein. Während Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus diesem Organismus ein hydrophiles, membranassoziiertes Enzym ist, ist die Hydrogenase, die nur bei Wachstum auf CO gebildet wird, ein integrales Membranenzym und damit vermutlich das eigentliche energiekonvertierende Enzym. Aufgrund seiner Labilität konnte auch dieses Enzym bisher nicht gereinigt werden.



Da *Ca. hydrogenoformans* ebenfalls mit CO als alleinigem Energiesubstrat wächst, wurde vermutet, dass die Hydrogenase aus diesem Organismus zu der oben beschriebenen Hydrogenase-Familie gehört. Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der Hydrogenase(n) aus *Ca. hydrogenoformans*. *Ca. hydrogenoformans* gehört zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt (39%). Der Organismus besitzt ein Wachstumsoptimum von 70 – 72°C und wurde erstmals von Zavarzin und Mitarbeitern aus den heißen Sümpfen der Kunashir-Inseln isoliert (Svetlichny et al., 1991; Svetlichny et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass *Ca. hydrogenoformans* autotroph mit 100% CO in der Gasphase als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle wächst. Als einzige Produkte wurden H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> gefunden. Andere Energiesubstrate wurden nicht beschrieben. Vor kurzem konnte aus diesem Organismus ein CO-oxidierender/H<sub>2</sub>-bildender Enzymkomplex gereinigt werden (Soboh, 2001).

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung der Reinigung und den katalytischen Eigenschaften des CO-oxidierender/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*. Dieser Enzymkomplex, der aus einer Hydrogenase und CO-Dehydrogenasen besteht, katalysiert die Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>.

Energiekonvertierende [NiFe]-Hydrogenasen konnten auch in anaeroben und fakultativ anaeroben Fermentierern identifiziert werden. Hydrogenase-3 aus *E. coli* ist besonders gut untersucht. *In vivo* katalysiert das Enzym die Bildung von H<sub>2</sub>. *E. coli*-Hydrogenase-3 ist Teil des Formiat:Hydrogen-Lyase-Komplexes (FHL), der die Spaltung des Gärungsproduktes Formiat in CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> katalysiert (Sawers, 1994).



Die Untereinheiten der Hydrogenase-3 werden durch das *hyc*-Operon kodiert. Aufgrund von Sequenzanalysen der Hyc-Proteine und aufgrund von Mutationsstudien konnte ein Modell zum Aufbau des Enzyms erstellt werden (Böhm et al., 1990; Sauter et al., 1992). Die Labilität des Enzyms hat bislang jedoch eine Reinigung verhindert. Die Umsetzung von Formiat zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> ist unter Standardbedingungen nicht exergon. Unter den natürlichen Wachstumsbedingungen (niedriger pH-Wert und niedriger H<sub>2</sub>-Partialdruck) wird diese Reaktion jedoch exergon ( $\Delta G' \approx -20$  bis  $-27$  kJ/mol), so dass eine Kopplung mit Energiekonservierung möglich ist.

Auch in anderen fermentierenden Mikroorganismen konnten energiekonvertierende [NiFe]-Hydrogenasen identifiziert werden. Das Genom von *P. furiosus* enthält das putative *mbhA-N*-Operon, welches für einen aus 14 Untereinheiten bestehenden, membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase-Komplex kodiert (Sapra et al., 2000; Silva et al., 2000). Es wird angenommen, dass dieser Enzymkomplex für die fermentative H<sub>2</sub>-Produktion in *P. furiosus* verantwortlich ist. Ein intakter Mbh-Komplex konnte bisher nicht gereinigt werden, jedoch katalysiert die Membranfraktion aus *P. furiosus* H<sub>2</sub>-Bildung mit reduziertem Ferredoxin, das aus *P. furiosus* gereinigt wurde. Mit invertierten Membranvesikeln von *P. furiosus* wurde gezeigt, dass H<sub>2</sub>-Bildung mit reduziertem Ferredoxin zur Generierung eines elektrochemischen Protonenpotentials führt, welches an ATP-Synthase gekoppelt ist. Zusätzlich zur Substrat-Stufen-Phosphorylierung gewinnt der Organismus Energie durch Respiration (Sapra et al., 2003). Das erklärt auch, warum *P. furiosus* eine ungewöhnliche Glykolyse hat, bei der Ferredoxin anstelle des normalerweise erwarteten NAD<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor bei der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Oxidation dient.

Darüber hinaus konnte in der im Jahr 2002 publizierte Genomsequenz von *Thermoanaerobacter tengcongensis* (Bao et al., 2002) ein Gencluster identifiziert werden, das für ein zu Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* eng verwandtes Enzym kodiert. *Ta. tengcongensis* ist ein thermophiles Gram-positives Bakterium, das vor kurzem aus einer heißen Quelle in China isoliert wurde (Xue et al., 2001). Der Organismus fermentiert Stärke zu Acetat, Ethanol, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>. Biochemische Untersuchungen an diesem Organismus wurden bisher nicht durchgeführt. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit zielte daher auf die Charakterisierung der Hydrogenasen in *Ta. tengcongensis*.

Es wurde gezeigt, dass *Ta. tengcongensis* Stärke oder Glukose über den Emden-Meyerhof-Stoffwechselweg zu Acetat, Ethanol, H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> fermentieren kann (Xue et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Organismus während der Fermentation zwei Hydrogenasen bildet, die eine zentrale Rolle im H<sub>2</sub>-Metabolismus spielen. Hierbei handelt es sich um eine heterotetramere NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase und eine Ferredoxin-abhängige membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase.

## III MATERIAL UND METHODEN

### 1 Verwendete Materialien

#### 1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel und Biochemikalien stammen von den Firmen Biomol (Hamburg), ICN Biomedicals (Eschwege), Merck Biosciences (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Weitere Chemikalien und Materialien sowie deren Hersteller, Bezugsquellen oder Spezifikationen sind in den entsprechenden Abschnitten im Text gesondert angegeben. Der Farbstoff zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde bei BioRad Laboratories (München) erworben.

#### 1.2 Anaerobenzelte und Gase

Arbeiten unter Sauerstoffausschluss wurden in Anaerobenzelten (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA) durchgeführt. Diese enthielten eine Atmosphäre aus  $N_2/H_2$  (95%/5%). Sauerstoff wurde aus der Atmosphäre kontinuierlich durch Reduktion mit  $H_2$  an einem Palladium-Katalysator (BASF, Ludwigshafen) entfernt.  $H_2O$  wurde der Zeltatmosphäre mittels Silica Gel Orange (Roth, Karlsruhe) entzogen. Formiergas ( $H_2/N_2$ , 95:5), Stickstoff (99,996 %), Wasserstoff (99,9995 %) und Kohlenmonoxid (99,997 %) wurden von Messer-Griesheim (Siegen) bezogen.

#### 1.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde für Puffer und Lösungen vollentsalztes Wasser verwendet. Dieses wurde aus einfach destilliertem Wasser mittels einer Entsalzungsanlage (Elgastat Maxima UF, Elga, Ransbach-Baumbach) hergestellt. Die Leitfähigkeit betrug 60 nS. Die für die Proteinreinigungen und Enzymassays verwendeten Puffer wurden per Unterdruck durch Membranfilter (0,45  $\mu m$ ) gezogen, unter  $N_2$ -Begasung aufgeköcht und abgefüllt. Zur vollständigen Anaerobisierung wurden die Puffer über Nacht in einem Anaerobenzelt unter einer  $N_2/H_2$ -Atmosphäre (95%/5%) gerührt. Den Puffern wurde 2 mM Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. In Enzymassays mit Viologenfarbstoffen wurde stattdessen Natriumdithionit als Reduktionsmittel verwendet.

Der Basispuffer enthielt 50 mM MOPS/KOH bei pH 7,0. Dieser Puffer ohne weitere Zusätze wird im Folgenden als Puffer A bezeichnet. Die für Enzymassays und Enzymreinigungen verwendeten Puffer wurden durch Membranfilter (0,2 µm; Pall-Filtron, (Dreieich) filtriert. Die Zusammensetzung von Puffern wird bei der jeweiligen Methode angegeben.

#### **1.4 Säulenmaterial, Filter und Membrane**

Die verwendeten FPLC-Säulenmaterialien und FPLC-Fertigsäulen (Q-Sepharose HiLoad, Superdex 200, DEAE-Sephacel und Source 30 Q) waren Produkte der Firma Amersham Biosciences (Freiburg). Die Konzentratoren (Amicon 8200 oder 8050) zum Entsalzen und Ankonzentrieren der proteinhaltigen Fraktionen mit Ultrafiltrationsmembranen, Amicon Microcon-Konzentratoren und Amicon Ultra-Konzentratoren (alle YM, Ausschlussgrenze 10, 30, 50 oder 100 kDa) wurden von Millipore (Eschborn) bezogen. Porendurchmesser von Filtern werden im weiteren Text als Maßzahl mit Einheit in Klammern an entsprechenden Stellen angegeben. Millipore lieferte auch Filter (0,22 µm) zum Sterilisieren von Flüssigkeiten und Gasen. Bei Western-Blot-Analysen wurden Nitrocellulose-Membranen (0,45 µm) und Filterpapier von Schleicher & Schuell (Dassel) verwendet. Die ProBlot-Membran, auf welche Polypeptide für aminoterminalen Sequenzierungen transferiert wurden, lieferte Applied Biosystems (Darmstadt).

## **2 Verwendete Organismen und Mikrobiologische Methoden**

### **2.1 Organismen**

*Carboxydotherrnus hydrogenofornans* (DSMZ 6008) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) bezogen.

*Thermoanaerobacter tengcongensis* strain MB4<sup>T</sup> wurde von Japan Collection of Microorganisms (JCM11007) bezogen.

### **2.2 Zellzucht**

*Carboxydotherrnus hydrogenofornans* wurde unter Standardbedingungen anaerob bei 70°C kultiviert (Svetlichny et al., 1991). Die Zusammensetzung des Mineralsalzmediums ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Der Organismus wurde unter kontinuierlicher CO-Begasung in Fermentern (15 l Glasfermenter mit 10 l Medium) kultiviert. Das Medium

wurde mit 1000 Upm gerührt, mit 750 ml/min CO/H<sub>2</sub>S (99.8%/0.2%) begast und auf 70°C temperiert. Kohlenmonoxid fungierte als Energie- und Kohlenstoffquelle. H<sub>2</sub>S diente als Schwefelquelle und zum Anaerobisieren des Mediums. Sobald das Medium anaerob war, was durch Farbänderung des zugefügten Redoxindikators Resazurin (1 ml 0,2 %ige Lösung / 10 l Medium) von violett nach farblos erkannt werden konnte, wurde mit 0,5 l einer Vorkultur angeimpft. Nach dem Überschreiten einer optischen Dichte 2 (Extinktionsmessung von mit Puffer verdünnten Proben bei 578 nm) wurde die Kultur auf 5°C abgekühlt. Die Zellen wurden anaerob mit einer Durchflußzentrifuge (Heraeus Contifuge 17RS, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 180 ml/min bei 15000 Upm abzentrifugiert.

***Thermoanaerobacter tengcongensis*** wurde bei 75°C und pH 7,5 sowohl in geschlossenen Flaschen als auch in Fermentern unter kontinuierlicher N<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Die Zusammensetzung des Mineralsalzmediums ist in Tabelle 2 aufgeführt. Das Medium wurde nach den Angaben von Xue (Xue et al., 2001) hergestellt. Das Medium wurde mit Trypton (2g /l) und Hefeextrakt (2g/l) versetzt. Als Energie- und Kohlenstoffquelle wurde lösliche Stärke (10 g/l) oder Glucose (25 mM) verwendet. Das Medium enthielt kein Natrium-Thiosulfat oder andere externe Elektronenakzeptoren. Die Kultivierung in geschlossenen Flaschen erfolgte in mit Butylgummistopfen verschlossenen 2-l Schottflaschen. Das Kulturvolumen betrug 1 l. Zur Anaerobisierung des Mediums wurde dieses in einem Anaerobenzelt unter 95% N<sub>2</sub>/5% H<sub>2</sub> gerührt, bis der dem Medium zugesetzte Redoxindikator Resazurin farblos wurde (ca. 6 h). Anschließend wurde das Medium in die Kulturflaschen abgefüllt und im verschlossenen Zustand autoklaviert. Die Gasphase wurde anschließend gegen 100% N<sub>2</sub> (1 bar) ausgetauscht und das Medium mit einer Vorkultur 10%ig angeimpft. Die Kulturflaschen wurden in einem Inkubationsschüttler (RFI-125, Infors) bei 75°C und einer Schüttelbewegung von 140 U/min inkubiert. Die Gasphase wurde im Abstand von etwa 5 h gegen 100% N<sub>2</sub> ausgetauscht. Die Zellernte erfolgte nach Erreichen einer optischen Dichte von 1,0. Die Kultivierung und Zellernte von *Ta. tengcongensis* in Fermentern erfolgte analog zu *Ca. hydrogenoformans*. Als Wachstumstemperatur wurde auf 75°C anstelle von 70°C eingestellt. Der Organismus wurde unter kontinuierlicher N<sub>2</sub>-Begasung (200 ml/min) kultiviert, das Medium mit 500 Upm gerührt. Nach dem Überschreiten einer optischen Dichte von 2 (Extinktionsmessung von mit Puffer verdünnten Proben bei 578 nm) wurde die Kultur auf 5°C abgekühlt und geerntet.

**Tabelle 1: Medium für *Ca. hydrogeniformans*****Zusammensetzung von 1 l Medium:**

970 ml H<sub>2</sub>O  
 10 ml Lösung A  
 10 ml Lösung B  
 10 ml Lösung C  
 0,5 g Natriumthiosulfat  
 1ml Vitamin-Lösung<sup>a</sup>  
 1ml Spurenelementlösung<sup>b</sup>  
 1ml Resazurinlösung<sup>c</sup>  
 1 g Natrium-Pyruvat  
 0,5 g Hefeextrakt

Komponente	Menge für 1 L Medium
<u>Lösung A</u>	
NH <sub>4</sub> Cl	33 g
MgCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	20 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	16 g
KCl	33 g
H <sub>2</sub> O	1 Liter
<u>Lösung B</u>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	33 g
H <sub>2</sub> O	1 Liter
<u>Lösung C</u>	
NaHCO <sub>3</sub>	50 g
H <sub>2</sub> O	1 Liter

a.) **Vitamin-Lösung:** 2 mg Biotin; 2 mg Folsäure; 10 mg Pyridoxal-HCl; 5 mg Thiamin-HCl; 5 mg Riboflavin; 5 mg Nicotinsäure; 0,1 mg Vitamin B<sub>12</sub>; 5 mg p-Aminobenzoesäure; 5 mg DL- $\alpha$ -Liponsäure; H<sub>2</sub>O ad 1 L; Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

b.) **Spurenelement-Lösung** 50 mg EDTA, 200 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 mg MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 30 mg H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 20 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O ad 1 L; Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

c.) **Resazurin-Lösung** 0.02 g/100 ml H<sub>2</sub>O

**Tabelle 2: Medium für *Ta. tengcongensis***  
**Zusammensetzung von 1 l Medium:**

Komponente	Menge für 1 L Medium
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
KCl	0.2 g
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0.5 g
NaCl	2 g
Cysteine-HCl	0.5
Hefeextrakt	2 g
Trypton	2 Liter
Stärke	10
Vitamin-Lösung <sup>a</sup>	1 ml
Spurenelement-Lösung <sup>b</sup>	1 ml
Resazurin-Lösung <sup>c</sup>	1 ml

a.) **Vitamin-Lösung:** 2 mg Biotin; 2 mg Folsäure; 10 mg Pyridoxal-HCl; 5 mg Thiamin-HCl 2 H<sub>2</sub>O; 5 mg Riboflavin; 5 mg Nicotinsäure; 0,1 mg Vitamin B<sub>12</sub>; 5 mg p-Aminobenzoesäure; 5 mg DL- $\alpha$ -Liponsäure; H<sub>2</sub>O ad 1 L; Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

b.) **Spurenelement-Lösung** 50 mg EDTA, 200 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 mg MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 30 mg H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 20 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O ad 1 L; Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

c ) **Resazurin-Lösung** 0.02 g/100 ml H<sub>2</sub>O

### 3 Biochemische Methoden

#### 3.1 Präparation von Zellextrakten und Isolierung der Membranfraktion

Die beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten anaerob unter einer N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>-Atmosphäre (95%/5%) bei 18 °C in einem Anaerobenzelt (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA). Unmittelbar nach der Zellzucht geerntete Zellen bzw. bei -20°C gelagerte Zellen (Feuchtzellmasse von 30 bis 50 g) wurden in 70 - 120 ml Puffer A resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (5 mg) wurden für 15 min bei 20°C inkubiert und anschließend in einem eisgekühlten Rosettengefäß mit Ultraschall (Ultraschall-Homogenisator Sonoplus

HD200 mit VS-70T als Sonotrode, Bandelin, Berlin) bei einer Ausgangsleistung von 200 Watt beschallt (5 x 6 min). Die effektive Beschallungsdauer betrug 25 min. Zellfreier Extrakt wurde durch anaerobes Überführen des Rohextrakts in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen und einer 20 minütigen Zentrifugation bei 8000 x g bei 4°C in einer Pro 80 Ultrazentrifuge mit T865-Rotor (Kendro, Hanau) erhalten. Zur Trennung von Membranproteinen und löslichen Proteinen wurde der Zellextrakt anschließend bei 160 000 x g für 2 h zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die löslichen Cytoplasmaproteine, während das Pellet aus sedimentierten Membranbruchstücken und in diesen eingeschlossenen Proteinen bestand. Der erhaltene Überstand wurde abgenommen und für die Aktivitätsbestimmung und Reinigung von löslichen Enzyme verwendet. Die Homogenisierung der Membranfraktion erfolgte in 130 ml Puffer A mit einem Teflon-Potter Handhomogenisator. Die Membranfraktion wurde gewaschen und nach der zweiten Zentrifugation bei 160 000 x g für 2 h mit etwa 200-300 ml Puffer A resuspendiert (1,8 mg protein ml<sup>-1</sup>).

### **3.2 Reinigung des CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus der Membranfraktion von *Ca. hydrogenoformans***

Die Zellen (ca. 40g Feuchtzellen) wurden wie im Kapitel 3.1 beschrieben aufgeschlossen. Von der gewaschenen Membranfraktion wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Pro mg Protein wurden 4.5 mg Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid zugegeben und mit Puffer A soweit verdünnt, dass eine Konzentration von 16 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid erhalten wurde. Dieser Ansatz wurde für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden nicht solubilisierter Proteine und Membrane durch eine Ultrazentrifugation bei 160 000 x g für 40 min abgetrennt. Solubilisierter Protein im Ultrazentrifugationsüberstand wurde anschließend auf eine zuvor mit Puffer A + 2mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid äquilibrierte Q-Sepharose HiLoad Anionenaustausch-Chromatographie Säule (2,6 x 15 cm) aufgetragen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte nach Waschen der Säule mit Puffer B in einem NaCl-Stufengradienten bei einer Flußrate von 5 ml/min mit je 60 ml 0,10 M, 0,20 M, 0,30 M, 0,40 M und 0,50 M NaCl. Die Fraktion mit CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzym-aktivität eluierte im Bereich von 0,30 M NaCl. Zur Erniedrigung der Salzkonzentration wurde diese Fraktion mittels Ultrafiltration an YM 100 Membranen auf 10 ml ankonzentriert und mit Puffer A auf 40 ml verdünnt und dann nochmals auf 10 ml



ankonzentriert. Anschließend wurde diese Fraktion auf Ceramic Hydroxyapatit-Säule (1,6 x 20 cm) (Bio-Rad) aufgetragen. Die Säule war mit 0,03 M Kaliumphosphat Puffer pH 7.0 + 2mM DTT+ 2 mM Detergens äquibriert. Im Anschluß an das Waschen der Säule mit 50 ml 0,03 M Kaliumphosphat-Puffer erfolgte die Elution bei einer Flußrate von 4 ml/min mit einem kontinuierlichen Kaliumphosphat-Gradienten von 0,10 M bis 1,0 M Kaliumphosphat Puffer (400 ml Elutionsvolumen). Während CO-oxidierende/H<sub>2</sub>-bildende Enzymaktivität bei 1,0 M Kaliumphosphat eluierte, eluierte bei 0,03 M Kaliumphosphat eine Fraktion die nur CO-Dehydrogenase-Aktivität enthielt. Die Fraktion mit CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildender Enzymaktivität wurde mittels Ultrafiltration auf 10 ml ankonzentriert, auf eine mit Puffer A + 2 mM Detergens + 0,1 M NaCl äquibrierte Superdex 200 Gelfiltrationssäule (26/60) aufgetragen und anschließend mit diesem Puffer eluiert. Die Fraktionen mit CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildender Enzymaktivität eluierten nach 187 ml (Peak Maximum) entsprechend einer molekularen Masse von 450 kDa. Thyroglobulin (670 kDa), Apoferritin (443 kDa),  $\beta$ -Amylase (200 kDa) und Alkohol dehydrogenase (150 kDa) wurden für die Eichung der Säule verwendet. Die Fraktionen mit CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildender Enzymaktivität wurden auf ein Volumen von 3 ml ankonzentriert und unter N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (95%/5%) bei 4°C gelagert.

### 3.3 Reinigung von Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CO-DH)

Nach dem Einstellen auf 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit einer 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung wurde die Fraktion mit CO-DH Aktivität nach Ceramic Hydroxyapatit (siehe 3.2) auf eine mit 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> äquibrierte Phenyl-Sepharose HiLoad Säule (2,6 x 10 cm) aufgetragen. Das adsorbierte Protein wurde mit einem fallenden (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Stufengradienten eluiert, jeweils 60 ml mit folgenden Konzentrationen: 1,4 M, 1,2 M, 1,0 M, 0,80 M, 0,60 M, 0,40 M, 0,20 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 100 ml Puffer A. Kohlenmonoxid-Dehydrogenase-Aktivität befand sich in der mit Puffer A eluierten Fraktion. Diese wurde auf eine mit Puffer A + 0,1 M NaCl äquibrierte Superdex 200 Gelfiltrationssäule (26/60) aufgetragen und anschließend mit diesem Puffer eluiert. Die Fraktionen eluierten nach 215 ml (Peak Maximum) entsprechend einer molekularen Masse von 120 kDa. Die Fraktionen wurden mit Puffer A gewaschen und auf ein Volumen von je 2 ml ankonzentriert.

### 3.4 Reinigung von membrangebundener Hydrogenase aus der Membranfraktion von *Ta. tengcongensis*

Alle Reinigungsschritte wurden unter strikt anaeroben Bedingungen unter einer  $H_2/N_2$  (5%/95%)-Atmosphäre durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch anaerobisiert und enthielten 2 mM Dithiothreitol (DTT). Die unter 3.1 beschriebene präparierte Membranfraktion wurde in 50 mM MOPS pH 7,0, 15 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid resuspendiert, so dass das Detergenz/Protein-Verhältnis 4,5:1 betrug. Solubilisation der Membranproteine erfolgte durch 12-stündige Inkubation bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nach Zentrifugation bei  $160\,000 \times g$  und 4°C befanden sich die solubilisierten Membranproteine im Überstand, welcher sodann auf eine Q-Sepharose HighLoad Chromatographiesäule ( $2,6 \times 15$  cm) aufgetragen wurde. Die Säule wurde zuvor mit 80 ml 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid äquilibriert. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte nach Waschen der Säule mit Puffer A in einem NaCl-Stufengradienten bei einer Flußrate von 5 ml/min mit je 80 ml 0,10 M, 0,20 M, 0,30 M, 0,40 M und 0,50 M NaCl in Puffer A, die Membran gebundene Hydrogenase-Aktivität eluierte im Bereich von 0,30 M NaCl. Anschließend wurde diese Fraktion auf Ceramic Hydroxyapatit ( $1,6 \times 20$  cm) (Bio-Rad) aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,03 M Kaliumphosphate Puffer pH 7.0 + 2 mM DTT + 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid äquilibriert. Im Anschluß an das Waschen der Säule mit 50 ml 0,03 M Kaliumphosphat Puffer erfolgte die Elution bei einer Flußrate von 4 ml/min mit einem kontinuierlich linearen Kaliumphosphat-Gradienten von 0,1 M bis 1,0 M (400 ml). Nach Elution der Membran-gebundenen Hydrogenase-Aktivität bei 1,0 M Kaliumphosphat wurden diese Fraktionen mit mittels Ultrafiltration auf 10 ml ankonzentriert, dann auf eine mit Puffer A + 0,1 M NaCl äquilibrierte Superdex 200 (26/60) Gelfiltrationssäule aufgetragen und anschließend mit diesem Puffer eluiert. Die Fraktionen mit Hydrogenase-Aktivität wurden auf ein Volumen von 3 ml ankonzentriert und unter  $N_2/H_2$  (95%/5%) bei 4°C gelagert.

### 3.5 Reinigung von NAD(H)-abhängiger Fe- Hydrogenase aus der löslichen Fraktion von *Ta. tengcongensis*

Alle Puffer, die für die Reinigung von NAD(H)-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase verwendet wurden, enthielten 2 mM FMN. Der Ultrazentrifugationsüberstand (siehe 3.1) wurde auf eine zuvor mit 80 ml Puffer A äquilibrierte Q-Sepharose-Säule ( $2,6$  cm  $\cdot$   $15$  cm)

aufgetragen. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 5 mL/min durch einen NaCl-Stufengradienten von je 80 mL 0 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M. Die Fraktionen mit NAD(H)-abhängiger Hydrogenase eluierten mit 0,3 M NaCl. Diese Fraktionen wurden auf 0,6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mit einer 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung eingestellt und auf eine Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie-Säule (Phenyl-Sepharose HiLoad, 2,6 x 10 cm) aufgetragen, die Säule war mit 0,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  äquilibriert. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 5 mL/min mit einem absteigenden  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stufengradienten von je 60 mL 0,8 M, 0,6 M, 0,4 M, 0,2 M, 0 M. NAD(H)-abhängige Hydrogenase-Aktivität eluierte mit Puffer A (0 M Ammoniumsulfat). Diese Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (YM-Membran; Ausschlussgrenze 50 kDa) ankonzentriert und entsalzt. Die nach der Phenyl-Sepharose erhaltenen Proben wurden auf eine mit Puffer A äquilibrierte Source 30 Q-Säule (5 cm · 10 cm) gegeben. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 5 mL/min mittels eines NaCl-Stufengradienten von je 100 mL (0, 0,12, 0,14, 0,16, und 0,18 M). NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase-Aktivität eluierte mit 0,2 M NaCl in Puffer A. Mittels Ultrafiltration (YM-Membran, Ausschlussgröße 50 kDa) wurden die Fraktionen mit NAD(H)-abhängiger Hydrogenase-Aktivität entsalzt und ankonzentriert. Im letzten Reinigungsschritt wurden die Fraktionen auf eine mit 0,1 M NaCl in Puffer A äquilibrierte Superdex 200-Säule (2,6 cm · 60 cm) aufgetragen. Die Elution von NAD(H)-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase erfolgte mit einer Flußrate von 2 mL/min mit demselben Puffer nach 220 mL (Peakmaximum). Anschließend wurde das Protein mittels Ultrafiltration ankonzentriert. Die Probe wurden unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre bei 4°C gelagert, bis sie für Analysen und Kristallisationsexperimente eingesetzt wurden.

### 3.6 Reinigung von Ferredoxin aus der löslichen Fraktion von *Ta. tengcongensis*

*Ta. tengcongensis* Ferredoxin wurde wie beschrieben unter anaeroben Bedingungen aus dem 160 000 × g Ultrazentrifugations- (UZ-) Überstand durch Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose HiLoad (2,6 × 15 cm) aufgereinigt (Elution bei 0,5 M NaCl). Nach dem Einstellen auf 1,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mit einer 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurde die Fraktion mit Ferredoxin auf eine mit 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  äquilibrierte Phenyl-Sepharose HiLoad Säule (2,6 x 10 cm) aufgetragen (Elution bei 0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Anschließend wurde die Fraktion mit Ferredoxin auf eine Gelfiltration Superdex 75-Säule aufgetragen (Elution nach 275ml; Peakmaximum). Das auf diese Weise isolierte Ferredoxin zeigte

Absorptionsmaxima im UV/Vis-Spektrum bei 280 und 390 nm. Das  $E_{390}/E_{280}$ -Verhältnis betrug 0,75, was für eine hohe Reinheit der Präparation spricht (Terlesky & Ferry, 1988). Für die Bestimmung der Ferredoxin-Konzentration wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von  $12,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bei 390 nm angenommen. Eine massenspektrometrische Untersuchung (MALDI-TOF) des Ferredoxins ergab eine molekulare Masse von etwa 5724 Da. Die Massenanalyse ergab außerdem, dass die Ferredoxin-Präparation offenbar homogen war und nicht etwa eine Mischung aus verschiedenen Ferredoxinen darstellte.

### 3.7 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Messung der Enzymaktivitäten wurde photometrisch in mit Naturkautschuk-Stopfen ( $5 \cdot 9 \cdot 20$ , Deutsch & Neumann, Berlin) verschlossenen Küvetten von Hellma (Müllheim/Baden) mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 1,5 mL durchgeführt. Die Küvetten wurden abhängig vom Test durch mehrmaliges Begasen und Evakuieren mit  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$  oder CO anaerobisiert. Die einzelnen Komponenten wurden als anaerobe Lösungen mit Hilfe von Hamilton-Spritzen (Bonaduz, Schweiz) zugegeben.

Zur Bestimmung der **Wasserstoffaufnahmeaktivität von Hydrogenase** mit Methylviologen als artifiziellm Elektronenakzeptor wurde unter einer  $\text{H}_2$ -Atmosphäre ( $1,2 \times 10^5 \text{ Pa}$ ) in einem 0,8 ml Testansatz (50 mM MOPS/KOH pH 7,0) standardmäßig die Reduktion des Farbstoffs (4 mM,  $\epsilon_{578} = 9,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) photometrisch bei 578 nm verfolgt. Etwa 0,03 mM des Redoxfarbstoffes wurden vor der Messung mit Natriumdithionit-Lösung (20 mM Stammlösung) reduziert ( $E_{578} = 0,3$ ). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein gestartet. 1 Unit (U) Enzymaktivität entspricht der Oxidation von 1  $\mu\text{mol H}_2$  pro min, gemessen über die Reduktion von 2  $\mu\text{mol}$  Methylviologen.

Zur Bestimmung der **Wasserstoffbildungsaktivität von Hydrogenasen** mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator wurde unter einer  $\text{N}_2$ -Atmosphäre ( $1,2 \times 10^5 \text{ Pa}$ ) im gleichen Testansatz wie oben beschrieben die Oxidation von reduziertem Methylviologen photometrisch verfolgt. Der Test enthielt 4 mM Methylviologen wovon ein Teil zuvor durch Natriumdithionit reduziert wurde ( $E_{578}$  von 3-4). 1 U Enzymaktivität entspricht der Reduktion von 2  $\mu\text{mol}$  Protonen zu 1  $\mu\text{mol H}_2$  pro min bzw. der Oxidation von 2  $\mu\text{mol}$  Methylviologen.

**Hydrogenase-Aktivität mit Ferredoxin als Elektronenakzeptor** wurde in einem 0,8 ml Testansatz der 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM DTT, 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid, 20  $\mu\text{M}$

Ferredoxin und 0.2 mM Metronidazol enthielt, bestimmt. Die Gasphase war 100% H<sub>2</sub> bei (1,2 x 10<sup>5</sup> Pa). Die Reduktion von Ferredoxin mit H<sub>2</sub> durch Hydrogenasen wurde anhand der anschließenden Reduktion von Metronidazol (Chen & Blanchard, 1979) bei 320 nm photometrisch verfolgt ( $\epsilon_{320} = 9,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). 1 U Enzymaktivität entsprach der Oxidation von 1  $\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1}$  (äquivalent zu der Reduktion von 1/3  $\mu\text{mol}$  Metronidazol).

**Ferredoxin-abhängige H<sub>2</sub>-Bildung mit Natrium-Dithionit als Elektronendonator.** Die 1 ml Testansätze enthielten 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 mM DTT, 20  $\mu\text{M}$  Ferredoxin (oder wie angegeben), sowie gereinigte Hydrogenase (1,5 mU). Die Gasphase war 100% N<sub>2</sub> bei (1,2 x 10<sup>5</sup> Pa). H<sub>2</sub>-Bildungs-Aktivitäten wurden in anaerob verschlossenen 8 ml Serumflaschen bei 75°C bestimmt. Die Testansätze wurden mit einem Magnetrührer stark gerührt. In Zeitabständen von 0,5 min wurden mit einer gasdichten Spritze Proben aus der Gasphase der Testansätze entnommen und der H<sub>2</sub>-Gehalt mittels Gaschromatographie bestimmt. Natrium-Dithionit reduzierte Ferredoxin, nicht aber Ech-Hydrogenase. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Hydrogenase gestartet. 1 U Enzymaktivität entspricht der Bildung von 1  $\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ .

**NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige-Hydrogenase-Aktivität** wurde durch die Bildung von NAD(P)H bei 340 nm gemessen. Die Reaktion wurde unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre (1,2 x 10<sup>5</sup> Pa) in einem 0,8 ml Testansatz (50 mM MOPS/KOH pH 7,0) standardmäßig über die Reduktion von NAD(P)<sup>+</sup> photometrisch bei 340 nm verfolgt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NAD(P)<sup>+</sup> (1.5 mM) oder Enzym (0.1U) gestartet. 1 U Enzymaktivität entsprach der Bildung von 1  $\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ .

**NAD(P)H-abhängige H<sub>2</sub>-Bildung** konnte durch die Bestimmung der H<sub>2</sub>-Konzentration in der Gasphase mittels Gaschromatographie verfolgt werden. Die 1 ml Testansätze enthielten 50 mM MOPS (pH 7,0), 2 mM DTT, 2 mM FMN, 1 mM Ti(III)Citrat sowie Hydrogenase (0,25 mU). Die Gasphase war 100% N<sub>2</sub> bei (1,2 x 10<sup>5</sup> Pa). H<sub>2</sub>-Bildungs-Aktivitäten wurden in anaerob verschlossenen 24-ml Serumflaschen bei 75°C bestimmt. Die Testansätze wurden mit einem Magnetrührer stark gerührt. In Zeitabständen von 0,5 min wurden mit einer gasdichten Spritze Proben aus der Gasphase der Testansätze entnommen und der H<sub>2</sub>-Gehalt mittels Gaschromatographie bestimmt. Nach 2 min Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von NAD(P)H (50mM) gestartet. 1 U Enzymaktivität entspricht der Bildung von 1  $\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ .

Zur Bestimmung der **NADH:Benzyldiologen Oxidoreduktase Aktivität** wurde unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre (1,2 x 10<sup>5</sup> Pa) in einem 0,8 ml Testansatz (50 mM MOPS/KOH pH 7,0) die NADH-abhängige Reduktion von Benzyldiologen (4 mM,  $\epsilon_{578} = 8,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

photometrisch bei 578 nm verfolgt. Etwa 0,03 mM des Redoxfarbstoffes wurden vor der Messung mit Natriumdithionit-Lösung (20 mM Stammlösung) reduziert ( $E_{578} = 0,3$ ). Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADH (0,2 mM) gestartet. 1 Unit (U) Enzymaktivität entspricht der Oxidation von 1  $\mu\text{mol H}_2$  pro min, gemessen über die Reduktion von 2  $\mu\text{mol}$  Benzylviologen.

**Der Einfluß von CO auf die H<sub>2</sub>-Bildungsaktivität von Hydrogenase** konnte durch die Bestimmung der H<sub>2</sub> -Konzentration in der Gasphase mittels Gaschromatographie verfolgt werden. Die 1 ml Testansätze enthielten 50 mM MOPS/KOH pH 7,0 + Detergens, 2 mM reduziertes Methylviologen, 3 mM Kaliumzyanid sowie 40  $\mu\text{g}$  gereinigter Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans*. H<sub>2</sub>-Bildung-Aktivitäten wurden in anaerob verschlossenen 8 ml Serumflaschen bei 70°C bestimmt. Auf die Testansätze unter ( $1,2 \times 10^5$  Pa) N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurde anschließend eine definierte Menge von Kohlenmonoxid gegeben, so dass die CO-Konzentrationen in der Gasphase von 0 -100% variierte, was einer CO Konzentration von 0 - 640  $\mu\text{M}$  in die Lösung entspricht. Die Testansätze wurden mit einem Magnetrührer stark gerührt. In Zeitabständen von 1 min wurden mit einer gasdichten Spritze Proben aus der Gasphase der Testansätze entnommen und der H<sub>2</sub>-Gehalt bestimmt. Zur Bestimmung der **Aktivität von Kohlenmonoxid-Dehydrogenase** wurde in einem 0,8 ml Testansatz (50 mM MOPS/KOH pH 7,0) unter einer CO -Atmosphäre (100%) ( $1,2 \times 10^5$  Pa) bei 70°C standardmäßig die Reduktion von Methylviologen (4 mM,  $\epsilon_{578} = 9,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) photometrisch bei 578 nm verfolgt. Etwa 0,03 mM des Viologenfarbstoffes wurden vor der Messung mit Natriumdithionit-Lösung (20 mM Stammlösung) reduziert ( $\Delta E_{578} \cong 0,3$ ). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein gestartet. 1 U Enzymaktivität entspricht der Oxidation von 1  $\mu\text{mol CO}$  zu CO<sub>2</sub> pro min gemessen anhand der Reduktion von 2  $\mu\text{mol}$  Methylviologen.

Bestimmung der **Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>**. Die Testansätze in 8 ml Serumfläschchen enthielten unter 100% CO-Atmosphäre (oder wie angegeben) 1 ml 50 mM Mops/KOH pH 7,0 mit 2 mM DTT. Die Testansätze wurden bei 70°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Enzymlösung, mittels einer Hamilton-Spritzen (Bonaduz, Schweiz) gestartet. In Zeitabständen von 0,5 min nach dem Start der Reaktion wurden mit einer gasdichten Spritze Proben aus der Gasphase der Testansätze entnommen und der H<sub>2</sub>-Gehalt mittels Gaschromatographie bestimmt. 1 U Enzymaktivität entspricht der Bildung von 1  $\mu\text{mol H}_2$ . Wie angegeben enthielten die Testansätze 1 mM Ti(III)citrat und das Enzym war zuvor mit 1 mM Ti(III)citrat aktiviert worden.

Zur Bestimmung der Aktivität von **Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase** wurde unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre ( $1,2 \cdot 10^5$  Pa) in einem 0,8 ml Testansatz (50 mM MOPS/KOH, pH 8) bei 70°C standardmäßig die Reduktion von Benzylviologen (2 mM,  $\epsilon_{578} = 8,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) photometrisch bei 578 nm verfolgt. Als Substrate wurden Pyruvat (jeweils 5 mM) und Coenzym A (0,15 mM) eingesetzt. Etwa 0,03 mM des Viologenfarbstoffes wurden vor der Messung mit Natriumdithionit-Lösung reduziert ( $\Delta E_{578} \cong 0,3$ ). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein gestartet.

Zur Bestimmung der **Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität (ADH)** wurde die Reduktion oder die Oxidation von NAD(P) bei 70°C photometrisch bei 340 nm verfolgt. 1 ml Testansatz enthielten 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1,5 mM NAD(P) und 1,2 Ethanol oder Isopropanol (Rückreaktion) oder 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,2 mM NAD(P)H, 1,2 mM Acetaldehyd und Enzym (3 U) (Vorwärts-Reaktion). 1 U Enzymaktivität entsprach der Oxidation oder der Reduktion von 1  $\mu\text{mol}$  NAD(P)(H) pro min.

Zur Bestimmung der **Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität (ALDH)** wurde die Acetaldehyd und CoenzymA abhängige Reduktion von NAD(P) bei 70°C photometrisch bei 340 nm verfolgt. 1 ml Testansatz enthielten 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1,5 mM NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup>, 1,2 mM Acetaldehyd, 1,5 mM CoA und Enzyme (1 mU). 1 U Enzymaktivität entspricht der Reduktion von 1  $\mu\text{mol}$  NAD(P)<sup>+</sup> pro min.

## 4 Analytische Methoden

### 4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mit dem BioRad-Mikroassay durchgeführt (BioRad, München). Das Testprinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliantblau R-250 in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Protein (Bradford, 1976). Der Testansatz enthielt 0-10  $\mu\text{g}$  Rinderserumalbumin (BSA) als Standard oder die Probe in 0,8 mL sowie 0,2 mL Proteinfarbstoffreagenz. Die Rinderserumalbumin-Lösung für die Eichgerade wurde von Pierce (Perbio Science, Bonn) bezogen. Die Absorption der Lösung wurde nach 15 min bei 596 nm mit einem Diodenarray-Spektralphotometer (Modell 8452A, Hewlett-Packard, Böblingen) bestimmt.

#### 4.2 Bestimmung von Glukosekonzentrationen mittels Glukoseoxidase (GOD) und Peroxidase (POD)

Glukoseoxidase oxidiert  $\beta$ -D-Glukose. Dabei wird der von der Glukose abgespaltene Wasserstoff mit Luftsauerstoff zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt. Peroxidase oxidiert 2,2-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat) (ABTS) durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einem grün-gefärbten Farbstoff. Der 1-ml Testansatz enthielt 0,9 ml Glukosereagenz (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  pH 7,0 mit 4 U Glukoseoxidase (GOD), 4U Peroxidase (POD) und 1mM ABTS. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe der Probe (100  $\mu\text{l}$ ). Nach 15 Minuten Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurde die Extinktion bei 436 nm bestimmt (Kunst et al., 1981).

#### 4.3 Bestimmung von Acetatkonzentrationen

Acetat wurde enzymatisch durch einen gekoppelten optischen Test mit Acetyl-CoA-Synthetase nach (Dorn et al., 1978) bestimmt. Der 1 ml Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCL pH 8,0; 100 mM KCl; 20 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 2,5 mM ATP- $\text{Na}_2$ ; 0,5 mM NADH- $\text{Na}_2$ ; 2,5 mM Phosphoenolpyruvat (PEP) aus Schweinemuskel; 8 U Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel, 11 U Laktat-Dehydrogenase aus Schweinemuskel und 1,4 U Myokinase. Der Test wurde vor Start der Reaktion 15-20 Minuten bei 37°C in 1-ml Eppendorfcups im Wasserbad inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte entweder durch Zugabe der Probe (10 -50  $\mu\text{l}$ ) oder durch Zugabe von 0,4 U Acetyl-CoA-Synthetase. Die Abnahme von NADH wurde bei 340 nm photometrisch verfolgt.

#### 4.4 Bestimmung von Ethanolkonzentrationen

Ethanol wird durch Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) in Gegenwart des Enzyms Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert.



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von Ethanol und  $\text{NAD}^+$ . Es kann jedoch durch  $\text{NAD}^+$ -Überschuss, alkalisches Millieu und Abfangen des Acetaldehyds durch Semicarbazid praktisch ganz nach rechts verschoben werden. Das während der Reaktion gebildete NADH ist der Ethanolmenge äquivalent und wird aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt.



Der 1 ml Testansatz enthielt 0,92 ml Puffer (100 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$  pH 8,8, 75 mM Semicarbazid HCl, 20 mM Glycin und 50  $\mu\text{l}$  Probe (max 4 mM Ethanol) Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Alkoholdehydrogenase (5U). Nach 60 min Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurde die Extinktion bei 340 nm bestimmt.

#### 4.5 Gaschromatographische Bestimmung von CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>

CO und CO<sub>2</sub> wurden gaschromatographisch mit einem Varian Aerograph Modell 2700 (Varian, Darmstadt) mit Flammenionisationsdetektor (FID) bestimmt. Die verwendete Säule und die Meßbedingungen sind aus Tabelle 3 ersichtlich. Als Standards wurden Gasgemische bekannter CO, bzw. CO<sub>2</sub>-Konzentration (10%; 20%; 35%; 50%; 75%; 90%; 100%) in N<sub>2</sub> verwendet. Nach Trennung der beiden Gase wurden diese über eine zwischen Säule und Detektor des Gaschromatographen eingebauten und auf 380°C erhitzten. Nickelkatalysator geleitet und zu Methan reduziert, das mittels FID detektiert wurde. H<sub>2</sub> wurde gaschromatographisch mittels einem Varian Aerograph Modell 1400 (Varian, Weiterstadt) mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) bestimmt. Die Meßbedingungen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Als Standard wurden Gasgemische (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>) bekannter H<sub>2</sub>-Konzentration (10%; 20%; 35%; 50%; 75%; 90%; 100% ) in N<sub>2</sub> verwendet. Bei allen Analysen wurde mit einer gasdichten Spritze eine 10  $\mu\text{l}$  Probe (CO; CO<sub>2</sub>) bzw. 0,3 ml (H<sub>2</sub>) aus der Gasatmosphäre des Gefäßes, in dem das jeweilige Experiment durchgeführt wurde bzw. in dem sich eine Standardgas Mischung befand, entnommen. Durch kurzes Öffnen des Spritzenventils erfolgte ein Druckausgleich, bevor die Probe in den Gaschromatographen injiziert wurde. Die Spritze wurde zwischen den Probenentnahmen mit 100% N<sub>2</sub> gespült.

**Tabelle 3: Bedingung für die gaschromatographische Bestimmung von CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>**

Einstellungen	CO und CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>
Detektor	FID	WLD
Trärgas	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
Trärgasdruck	200 kPa	110 kPa
Säule	Edelstahl (2 m x 2 mm)	Edelstahl (2 m x 3,2 mm)
Säulenfüllung	Poropak 50 – 80 mesh	Molekularsieb 5 Å
Temperatur		
	Injektor	120 °C
	Säule	40 °C
	Detektor	120 °C
	Ni-Katalysator	380 °C
		--
Retentionszeit	7,8 min / 1,4 min	1 min

WLD: Wärme-Leitfähigkeits-Detektor, FID: Flammen-Ionisations-Detektor, T: Temperatur, t<sub>R</sub>: Retentionszeit.

#### 4.6 Quantitativer Nachweis von Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel.

**Nicht-Häm-Eisen** wurde durch Inkubation des Proteins mit salzsaurer Kaliumpermanganat-Lösung freigesetzt, mit Ascorbinsäure zu Fe<sup>2+</sup> reduziert und anschließend als Ferrospectral (siehe unten) nachgewiesen (Fish, 1988).

Durchführung des Tests:

Lösung A: 2,25%ige Kaliumpermanganat-Lösung in 0,6 N HCl

Lösung B: Die wässrige Lösung enthielt 6,5 mM Ferrospectral (3-(2-pyridyl)-5,6 bis-(4-phenylsulfonat)-1,2,4-Tiazin, Dinatriumsalz), 13,1 mM Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin), 2 M Ascorbinsäure und 5 M Ammoniumacetat.

Proben bzw. Standardlösung (0,1 - 2 µg Eisen) wurde mit 0,2 ml Lösung A versetzt und die Mischung 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 40 µl Lösung B versetzt. Diese Mischung wurde für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf 1 ml aufgefüllt. Die Extinktion

wurde bei 562 nm bestimmt. Als Standard wurde eine  $\text{Fe(III)Cl}_3$ -Lösung (Titrisol, Merck) verwendet.

**Bestimmung von säurelabilem Schwefel** Eisen-Schwefel-Zentren des Proteins wurden mit Schwefelsäure hydrolysiert, freigesetztes Sulfid zunächst als Zinksulfid gebunden und mit N,N'-Dimethyl-p-phenylendiamin in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen zu Methylenblau umgesetzt. Methylenblau wurde aufgrund seiner Adsorption bei 670 nm photometrisch nachgewiesen. Als Standard wurde eine 100 mM Natrium-Sulfid-Lösung verwendet (modifizierte Methode nach (Cline, 1969).

Durchführung des Tests:

Lösung A: 2%ige Zinkacetat-Lösung

Lösung B: 0,2%ige Lösung von N,N'-Dimethyl-p-phenylendiammoniumchlorid in 3,75 M wäßriger  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Lösung C:  $\text{NH}_4\text{Fe(III)(SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ , 10%ige wässrige Lösung

Der Test wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dabei wurden 0,1 ml Lösung A vorgelegt und nacheinander das jeweilige Volumen der Probe oder Standardlösung (0-25 nmol  $\text{S}^{2-}$ ), 0,1 ml Lösung B und 5  $\mu\text{L}$  Lösung C zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 670 nm bestimmt.

#### 4.7 Quantitativer Nachweis von Flavinnukleotiden durch HPLC

Nicht kovalent gebundene Flavinnukleotide wurden nach Denaturierung und Fällung des Proteins mit Trichloressigsäure im Überstand nachgewiesen. Nachweis und Quantifizierung nicht kovalent gebundener Flavinnukleotide sind nachfolgend beschrieben. 500  $\mu\text{L}$  (1,5 mg) Enzymlösung wurden mit 60  $\mu\text{L}$  50%iger Trichloressigsäure versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Ausgefallenes Protein wurde danach 20 min bei 15.000 x g abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 100  $\mu\text{L}$  5%iger Trichloressigsäure gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände aus beiden Zentrifugationsschritten mit den darin enthaltenen nicht kovalent gebundenen Flavinnukleotiden wurden vereinigt und mit 140  $\mu\text{L}$  2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  auf einen pH von 6,0 eingestellt. Die Proben wurden mittels HPLC (Sykam, Duisburg) analysiert. Dazu wurde der Trichloressigsäure-Überstand auf eine LiChroCART RP 18 HPLC-Säule (5  $\mu\text{m}$ , 12,5 cm · 0,4 cm) von Merck Biosciences (Darmstadt) aufgetragen. Die Standards (FMN oder FAD) für die Kalibrierung wurden wie die Proben behandelt und auf pH 6,0 eingestellt. Die Elution erfolgte mit 25% Methanol in

50 mM Ammoniumformiat. Die Detektion erfolgte über ein Diodenarray-Array-Photometer. Dadurch wurde zu jedem Zeitpunkt des Laufs ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Die Standards dienten als qualitative und quantitative Referenzen.

#### 4.8 Ermittlung der Polypeptidzusammensetzung durch SDS-PAGE

Proteine wurden zur Reinheitskontrolle von Enzympräparationen, zur Bestimmung der apparenten molekularen Massen von Enzymuntereinheiten und zur Vorbereitung von Protein-Blots mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einer BioRad Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean II, BioRad, München) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Gele (80 mm × 65 mm × 0,75 mm) ist in Tabelle 4 beschrieben. Die 40%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37:1) wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Der Tris/Glycin-Elektrodenpuffer pH 8,8 bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer (63 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (w/v) Glycerin, 16 mM DTT, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) 1:2 verdünnt und 60 min bei Raumtemperatur denaturiert. Alternativ wurden die Proben für 5 min bei 100°C denaturiert. Von diesen Probenlösungen wurden 10 – 15 µg Protein pro Geltasche aufgetragen und eine Spannung von 150-180 V angelegt, bis der Bromphenolblau marker das untere Ende des Gels erreicht hatte. Der Tris/Glycin-Elektrodenpuffer pH 8,8 bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS.

Als Molekularmassenstandard diente das Low Molecular Weight Calibration Kit von AP-Biotech (Freiburg) bestehend aus Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Eialbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin Inhibitor (Sojabohne; 20,1 kDa) und Lactalbumin (14,4 kDa).

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurden die Gele 2 – 4 h in einer Lösung, die aus 0,05% (w/v) Coomassie Brilliantblau R 250, 0,05% (w/v) Crocein Scarlet 7B und 0,5% (w/v) CuSO<sub>4</sub> in Wasser/Isopropanol/Essigsäure (65:25:10) bestand, bei 25°C inkubiert. Das Entfernen von nicht Protein-gebundenem Farbstoff erfolgte anschließend bei 20 °C für 2 – 3 h mit einer Mischung aus Wasser/Isopropanol/Essigsäure (81:12:7), die 0,5% (w/v) CuSO<sub>4</sub> enthielt.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der SDS<sup>a)</sup>-Polyacrylamid-Gele.**

<b>Lösung</b>	<b>Trenngel (14%ig)</b>	<b>Sammelgel (4%ig)</b>
Tris/HCl	2,5 mL (1,5 M, pH 8,8)	0,5 mL (0,5 M, pH6,8)
40% Acrylamid-Lösung <sup>b.)</sup> (Acrylamid/Bisacrylamid 37:1 )	3,5 mL	0,2 mL
H <sub>2</sub> O	ad 10 mL	ad 2 mL
TEMED <sup>c.)</sup>	6 µL	6 µL
10% (w/v) APS <sup>d.)</sup>	60 µL	15 µL

a.) Natriumdodecylsulfat

b.) Acrylamid/Bisacrylamid wurde als Feststoff von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und nach Angabe des Herstellers in H<sub>2</sub>O gelöst

c.) *N, N, N', N'*-Tetramethylethyldiamin

d.) Ammoniumperoxodisulfat

### **Denaturierende SDS-PAGE mit Alkylierung**

Cysteinreiche Sequenzen in Polypeptiden, zum Beispiel in [Fe-S]-Cluster-Bindemotiven, können durch Oxidation der Thiolgruppen zur Quervernetzung führen. Das resultierende diffuse Laufverhalten führt zu unscharfen Banden. Durch Alkylierung können die Thiolgruppen vor Oxidation geschützt werden. Dadurch kommt es zu einer schärferen Trennung der Polypeptidketten im Gel. Es wurde im Prinzip wie unter 4.8 beschrieben vorgegangen. Der Probenpuffer enthielt hier 400 mM Tris/HCl pH 8,0 und 1% SDS. In diesem wurden die Proben 1:2 verdünnt. Dann wurde 1/100 des Probenvolumens einer 2,6 M Dithiothreitol-Lösung zugesetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min gekocht bzw 60 min bei Raumtemperatur denaturiert. Es wurde 1/10 des Probenvolumens einer 20% (w/v) Iodacetamid-Lösung zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgetragen. Die weitere Vorgehensweise stimmte wieder mit Abschnitt 4.8 überein.

#### **4.9 Bestimmung der Stöchiometrie der verschiedenen Untereinheiten des CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes von *Ca. hydrogenoformans***

Zwei unterschiedliche Methoden wurden durchgeführt. Beide Methoden beruhen auf der Coomassie-Färbung, die an Proteinbanden in SDS-Gelen gebunden ist. Zuerst wurde das mit Coomassie-gefärbte SDS-Gel gescannt (Scantouch 210, Nikon) und die Proteinbande wurden mit der Image-Quant Software (Molecular Dynamics) quantitativ bestimmt.

Bei der zweiten Methode wurden die Proteinbande aus dem Gel ausgeschnitten und der an die Proteinbande gebundene Coomassie-Farbstoff extrahiert. Die Extraktion erfolgte durch Inkubation der Proteinbande in 200 µM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> in 50% Acetonitril für 14 Stunden unter kräftigem Schütteln bei Raumtemperatur, was zu einer vollständigen Extraktion des Coomassie-Farbstoffs führte. Gel-Stücke wurden bei 5.000 x g abzentrifugiert. Die Menge der Farbe, die im Extrakt vorhanden ist, wurde photometrisch bei 590 nm quantifiziert.

#### **4.10 Extraktion der hydrophoben Untereinheiten aus dem CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildende Enzymkomplex von *Ca. hydrogenoformans***

Zu 350 µg gereinigtem Enzym in 100 µl Puffer A + Detergens wurden 900 µl Chloroform/Methanol (67/33, v/v) zugegeben. Die Mischung wurde auf Eis für 15 min inkubiert, dann bei 10.000 x g für 20 zentrifugiert. Die in der aus Chloroform/Methanol bestehenden organischen Phase gelösten hydrophoben Proteine, wurden in einer SpeedVac getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in SDS-Probenpuffer gelöst und mittel SDS-PAGE analysiert.

#### **4.11 In-Gel Trypsin-Verdau oder CNBr-Spaltung von Proteinen**

Die Untereinheiten gereinigter Enzyme wurden durch SDS-PAGE von einander getrennt. Die Proteinbanden wurden nach Färbung ausgeschnitten, mit 200 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> in 50%igem Acetonitril von Coomassie Brilliant Blau vollständig entfärbt (dreimal) und anschließend in einer SpeedVac getrocknet. Die Gel-Stücke wurden in einer Lösung von 0.2 µg Trypsin / µl) in 40 mM Ammonium-Hydrogencarbonat Puffer pH 8.1 und Acetonitril (9:1, v/v) für 14 h bei 37°C inkubiert. Bei der CNBr-Spaltungen wurden die Gel-Stücke in einer Lösung von 1M CNBr in 70% TFA für mindestens 14 h unter N<sub>2</sub> bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Peptide aus den Gelstücken durch

dreimalige Behandlung mit Ultraschall für 20 min in 30 µl Acetonitril/Wasser/TFA (60/39/1, v, v, v) extrahiert. Die Extrakte wurden zusammengefügt und mittel SpeedVac ankonzentriert. Die konzentrierte Lösung wurde mit einem ZipTipC18 (Millipore, Bad Homburg) entsalzt. Peptide wurden von ZipTipC18-Säule mit einer Lösung von 10mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxysuccinaminsäure in Acetonitril/H<sub>2</sub>O/TFA (70/30/0.1, v/v/v) eluiert. Anschließend wurden Aliquots von 1 µl des Eluats auf einen Probenträger pipettiert und an der Luft trocknen gelassen. Spektren wurden mittels eines Voyager DE RP MALDI –TOF Massenspektrometers erhalten. Die Genauigkeit der externen Kalibrierung war im Allgemeinen kleiner als 0.02%.

#### 4.12 Bestimmung von aminoterminalen Aminosäuresequenzen

Proteinproben wurden aus ungefärbten SDS-Polyacrylamidgelen durch Elektroblothing in einer Semi Dry Transfer Zelle (Modell Trans-Blot SD, BIO-RAD Laboratories, München) auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (ProBlott PVDF-Membran, Applied Biosystems, Weiterstadt) übertragen. Als Transferpuffer wurde ein Zweikomponenten-Tris/Glycin-Puffersystem in Tabelle 5 gezeigt. Der Elektrotransfer wurde bei einem konstanten Strom von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> über eine Dauer von 3 h nach Vorschrift des Herstellers der PVDF-Membranen durchgeführt.

**Tabelle 5: Transferpuffer für Western-Blots, Zweikomponentensystem**

Membranseite (+ Pol )	Gelseite ( - Pol)
Tris 25 mM	Tris 25 mM
Glycin 192 mM	Glycin 192 mM
SDS 0,01% (w/v)	SDS 0,1% (w/v)
Methanol 25% (w/v)	Methanol 10% (w/v)

Auf die Membran transferierte Proteine wurden 1 min mit 0,1% Coomassie Brilliantblau R 250, gelöst in Wasser/Methanol/Essigsäure (59:40:1), gefärbt. Das Entfernen von nicht Protein-gebundenem Farbstoff erfolgte durch Waschen mit Wasser/Methanol (1:1). Anschließend wurden die Membranen zur Entfernung des Glycins aus dem Transferpuffer gewässert (48 h; 5 l destilliertes Wasser, dreimal gewechselt). Die Proteinbanden wurden

ausgeschnitten und von Herrn Dr. D. Linder am Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Hilfe eines automatischen Gasphasensequencators nach der Edman-Methode (Hewick et al., 1981) aminoterminal sequenziert.

## **5 Biophysikalische Methoden**

### **5.1 UV/Vis-Spektroskopie**

UV/Vis-Spektren von Proteinen wurden an einem Diodenarray-Photometer (Modell Specord S10, Zeiss, Jena) bei Raumtemperatur bestimmt. Dazu wurden die Enzymproben (1-2 mg/mL; 0,7 mL) in 1-mL Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm anaerob überführt. Zur Reduktion des Enzyms wurde anaerobe Natriumndithionit-Lösung (20 mM) verwendet, zur Oxidation Luftsauerstoff.

### **5.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie von Polypeptiden**

Die Bestimmung der molekularen Masse von aus *Ta. tengcongensis* gereinigtem Ferredoxin und die Analyse der Peptide aus dem Verdau der hydrophoben Untereinheiten des Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans* (siehe 4.11) wurde mittels MALDI-TOF-MS (Voyager Spectrometer DE-RP, Applied Biosystems, Weiterstadt) vorgenommen. Die Beschleunigungsspannung betrug 25.000 V, die Gitterspannung lag bei 90%. Die Delay-Zeit betrug 600 ns. Als Matrix diente eine gesättigte Sinapinsäure-Lösung in Acetonitril/H<sub>2</sub>O/Trifluoressigsäure (67/33/0,1; v/v/v). Sie wurde mit der zu bestimmenden Probe verdünnt.

### **5.3 Bestimmung von Ni mittels Atomabsorptions-Spektroskopie**

Der Nickel-Gehalt des gereinigten Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans* sowie der Hydrogenasen aus *Ta. tengcongensis* wurde mit einem Zeeman/3030 Atomabsorptionsspektrometer (Perkin Elmer, Überlingen) mit Untergrundkorrektursystem, das mit einem Perkin Elmer HGA-600 Graphitofen und einem Perkin-Elmer AS 60 Probenautomaten ausgestattet war, analysiert. Die Probe wurde mit deionisiertem Wasser



so verdünnt, dass die Meßwerte im Bereich der Eichkurven lag, die im Bereich 0-400 pg/ml linear war. Das Probenvolumen betrug 20 µl.

## **5.4 Aufnahme und Auswertung von EPR-Spektren**

### **5.4.1 Grundlagen der EPR-Spektroskopie**

Die EPR-Spektroskopie beruht auf der Messung von Energiedifferenzen bei der Wechselwirkung ungepaarter Elektronen mit einem von außen angelegten Magnetfeld. Das EPR-Spektrum wird als Spektrum erster Ableitung aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgt über Computerprogramme. Für eine ausführliche Beschreibung der Grundlagen der EPR-Spektroskopie muß auf einschlägige Literatur verwiesen werden (Winter, 1998)

### **5.4.2 Vorbereitung der EPR-Proben**

Die EPR-Probenröhrchen bestanden aus hochreinem Quarzglas (99,99%) mit einem Innendurchmesser von 3 mm bei einer Wandstärke von 0,5 mm. Die Anaerobisierung der Röhrchen und des Verschlussmaterials erfolgte durch Lagerung im Anaerobenzelt unter N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (95%/5%). Sie wurden mit 300 µL Probe befüllt und mittels eines Plastikstabes und eines 3 cm langen Latexschlauchs verschlossen. Nach dem Befüllen wurden die Röhrchen verschlossen und außerhalb des Zeltes bei 75°C unter N<sub>2</sub> autooxidiert und dann in flüssigem Stickstoff (77 K) eingefroren. Nach dem Einfrieren wurde der Latexschlauch eingeschnitten, um das Entstehen eines Überdruckes beim späteren Auftauen des Röhrchens zu vermeiden. Bei Lagerung der Proben in flüssigem Stickstoff sollten sich die EPR-Signale in Ihrer Art und Intensität nicht verändern.

### **5.4.3 Aufnahme von EPR-Spektren**

EPR-Spektren wurden bei etwa 9,45 GHz (X-Band) in einem Bruker EMX-6/1 EPR-Spektrometer, bestehend aus einer EMX 1/3 Konsole, einer 041 X6 Brücke mit eingebautem ER-0410-116 Frequenzzähler, einem ER-070 Magneten und einem ER-4102 Hohlraumresonator (Standard-Cavity), bei einer Feld-Modulationsfrequenz von 100 kHz aufgezeichnet. Die Mikrowellenleistung betrug 20 mW bei einer Modulationsamplitude von 10,68 G. Die Kühlung der Proben erfolgte in einem Helium-Flusssystem in einem

Kryostaten mit einem Temperatursensor (ESR 900 cryostat, Oxford Instruments, Wiesbaden). Dabei wurde Software von Bruker genutzt.

#### 5.4.4 Interpretation und Quantifizierung von EPR-Daten

Die Auswertung der EPR-Spektren erfolgte mit einem Programm, das von Simon Albracht entwickelt und zur Verfügung gestellt wurde. Die Grundlagen der Quantifizierung und Simulation von EPR-Daten sind von Beinert und Albracht beschrieben worden (Beinert & Albracht, 1982).

### 6 Protein-Kristallisationsexperimente

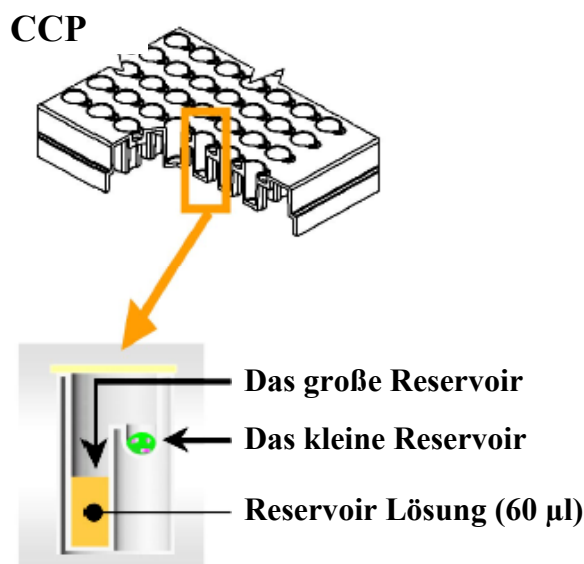
Protein-Kristallisationsexperimente wurden mit zwei modifizierten Dampfdiffusionsmethoden durchgeführt (Davies et al., 1971). Die ersten Kristallisationsansätze wurden nach der „sitting drop“ Methode durchgeführt. Nachdem sich die Bedingungen gezeigt haben, unter denen die Proteine kristallisierten, wurde eine weitere Optimierung nach der Methode „hanging drop“ durchgeführt. Bei diesen Methoden wird die Löslichkeitsgrenze einer konzentrierten Proteinlösung in einem langsamen Äquilibrierungsprozeß durch Dampfdiffusion vom Tropfen in das Reservoir überschritten und das Protein kann unter günstigen Bedingungen auskristallisieren. Die für die Einstellung des Gleichgewichts benötigte Zeit hängt von folgenden Faktoren ab: der verwendeten Reservoir Lösung, der Temperatur, der Oberfläche des Tropfens und dem Abstand des Tropfens vom Reservoir.

Vor der Kristallisation wurde das Protein auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200) gegeben, um eine homogene Lösung zu erhalten. Das Protein wurde mit 100 mM NaCl in 50 mM MOPS/KOH pH 7 bzw. in 50 mM Tris/ HCl pH 7,5 und 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid eluiert. Gereinigtes Protein wurde zunächst durch Ultrafiltration (Centricon 100) durch mehrmaliges Waschen gegen 10 mM MOPS/KOH pH 7 und 0.5 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid umgepuffert. Zum Ansetzen der Kristalle wurden 1  $\mu$ l Proteinprobe (10-20 mg/ml) mit 1  $\mu$ l Reserviörlösung gemischt. Alle Kristallisationsansätze wurden sowohl aerob bei 4°C, als auch anaerob bei 18°C oder 8°C durchgeführt.

Für Kristallisationsversuche wurde gereinigter Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans*, Ech Hydrogenase aus *Ms. barkeri*, NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis* verwendet.

### 6.1 Protein-Kristallisation nach der „sitting drop“-Methode

Das Kristallisationsexperiment nach der „sitting drop“ Methode lief wie folgt ab: Mit elektronisch programmierbaren Mikropipetten (Rainin 1-Kanal 10  $\mu$ L, 8-Kanal 10  $\mu$ L und 12-Kanal 200  $\mu$ L, Rainin, Mettler Toledo, Giessen) wurden die zum Großteil kommerziell erworbenen Kristallisationspuffer in die Proteinkristallisations-Mikroplatten im 96-Well-Format (CCP) (Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande) pipettiert. (**Abb. 7**) zeigt schematisch eine CCP.



**Abb. 7:** Die Corning Kristallographieplatte (CCP) hat Platz für 96 Kristallisations-Experimente. Jede Kammer besteht aus einem großen Reservoir für den Kristallisationspuffer oder „Mutterlauge“ (mother liquor) und einem kleinen Reservoir, um den Proteintropfen zu halten. Um Dampfdiffusion und spätere Betrachtung unter dem Binokular zu ermöglichen, wird die Platte mit durchsichtiger Klebefolie versiegelt (Villasenor et al., 2002).

Die Lösungen aus den verwendeten Screening-Kits (576 verschiedene Bedingungen) (JenaScreen 1-10, Jenabioscience, Jena; Structure Screen 1 + 2, Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA; Crystool I (Design Dr. B. Mamat, MPI Frankfurt), <http://www-structure.llnl.gov/crystool>) wurden mittels 12-Kanalpipette aus den Vorratsgefäßen auf die CCPs verteilt. Je 60  $\mu$ L des Kristallisationspuffers wurden dabei in das große Reservoir der

CCP überführt. Mit einer Einkanalpipette wurden je 1  $\mu$ L Proteinlösung in das kleine Reservoir pipettiert. Mit der 8-Kanal-Pipette wurden dann aus dem Puffer-Reservoir je 1  $\mu$ L zur Proteinlösung im kleinen Reservoir der Kammer pipettiert. Dieses führte zu einer 1:2 Verdünnung der Proteinlösung. Die Kammern wurden mit klarem Klebeband versiegelt. Somit war die Kontrolle auf Kristallbildung mittels Binokular (Zeiss, Göttingen) möglich. Mit dieser Hochdurchsatzmethode konnten in relativ kurzer Zeit etwa 600 Bedingungen zur Kristallisation von jedem Protein (siehe oben) anaerob bei je 8°C und 18°C und aerob bei 4°C getestet werden.

## 6.2 Protein-Kristallisation nach der „hanging drop“-Methode

Die „hanging drop“-Methode wurde zur Optimierung und Verfeinerung der Kristallisation verwendet. Dies geschah in der Variation der Salz-Konzentration, pH-Wert, Art und Menge des verwendeten Detergens und der Proteinkonzentration. Für die Kristallisationsexperimente nach der „hanging drop“-Methode wurden die Zellkulturschalen der Firma Sarstedt mit 24 Kammern verwendet. Zunächst wurden die Ränder der Kammern mit mittelviskosem Silikonfett (Baysilon Paste mittelviskos; Bayer AG, Leverkusen) beschichtet. Die Reserviörlösung wurde direkt in den Kammern angesetzt und vor dem Kristallisationsansatz bei 4°C eine halbe Stunde bei 100 upm auf einem Schüttler durchmischt.

Die Proteinprobe (10-20 mg/ml ) wurde mit der Reserviörlösung im Verhältnis von 1 $\mu$ L:1 $\mu$ L auf ein silanisiertes Deckgläschen (20 mm x 20 mm) gegeben. Das Deckgläschen wurde umgekehrt auf die Kammer gelegt und somit die Kammer verschlossen. Die Deckgläschen wurden vorher silanisiert um das Glas zu säubern und die Oberflächenspannung herabzusetzen. Dazu wurden die Deckelgläser für 10 min in Repel-Silan getaucht, dann in Ethanol und Wasser gewaschen und bei 37° C bis zum Gebrauch getrocknet.

## IV ERGEBNISSE

Der erste Abschnitt des Ergebnisteils beschäftigt sich mit der Reinigung und der biochemischen Charakterisierung eines CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*, der die Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> katalysiert. Erste Untersuchungen hierzu wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt (Soboh, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Reinigung optimiert, für alle Untereinheiten des Komplexes die kodierenden Gene identifiziert und die molekularen und katalytischen Eigenschaften bestimmt.

Der zweite Abschnitt des Ergebnisteils beschäftigt sich mit der Reinigung und der biochemischen Charakterisierung einer membrangebundenen Ferredoxin-abhängigen [NiFe]-Hydrogenase (Ech) und einer NAD(H)-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase aus der löslichen Fraktion von *Ta. tengcongensis*. Um die physiologische Rolle der beiden Hydrogenasen aufzuklären, wurde die H<sub>2</sub>-Bildung und die Bildung anderer Fermentationsprodukte in *Ta. tengcongensis* Kulturen bestimmt, die bei einem unterschiedlichen p(H<sub>2</sub>) kultiviert wurden. Außerdem wurde der Einfluss des p(H<sub>2</sub>) auf die Bildung der beiden Hydrogenasen sowie auf die Bildung von Alkohol-Dehydrogenase und Aldehyd-Dehydrogenase in Zellextrakten von *Ta. tengcongensis* bestimmt.

### 1. Reinigung und Charakterisierung eines CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*

#### 1.1 Reinigungseigenschaften eines CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*

Im Rahmen der Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Zellextrakte von *Ca. hydrogenoformans* die Reduktion von Methylviologen durch H<sub>2</sub> mit einer spezifischen Aktivität von etwa 15 U (mg Protein)<sup>-1</sup> und die Reduktion von Methylviologen durch CO mit einer spezifischen Aktivität von etwa 300 U (mg Protein)<sup>-1</sup> katalysieren. Nach einer Ultrazentrifugation wurde etwa 80-90% der Hydrogenase-Aktivität und 60-70% der CO-Dehydrogenase-Aktivität in der Membranfraktion gefunden. Die Membranfraktion

katalysiert ebenfalls die Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>. Die Membranfraktion wurde mit Puffer A + 0.5% Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid gewaschen. Etwa 99% der Hydrogenase-Aktivität und 60% der CO-Dehydrogenase-Aktivität sind in der gewaschenen Membranfraktion verblieben. Für eine weitere Enzymreinigung wurde ausschließlich die gewaschenen Membranfraktion verwendet. Nach Behandlung der Membranfraktion mit dem Detergens Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (16 mM) und einer weiteren Ultrazentrifugation wurden mehr als 95% der Enzymaktivitäten im Solubilisat gefunden, während nur ein geringer Prozentanteil in der Membranfraktion verblieb. Auffällig war eine deutliche Zunahme der Hydrogenase-Aktivität nach Solubilisierung. Möglicherweise ist das Enzym nach Solubilisierung besser für Viologenfarbstoffe zugänglich. Die Reinigung des solubilisierten Enzyms erfolgte zunächst mittels Anionenaustausch-chromatographie an Q-Sepharose HiLoad, an Hydroxyapatit und mittels Gelfiltrations-chromatographie an Superdex 200. Von der Gelfiltrationssäule eluierte das Enzym nach etwa 187 ml, was einer molekularen Masse von etwa 445 kDa entspricht. Die auf diese Weise erhaltene Enzympräparation enthielt nicht nur Hydrogenase-Aktivität, sondern katalysierte auch die Reduktion von Viologenfarbstoffen durch CO und die Bildung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> aus CO. In der Reinigungstabelle (Tabelle 6) sind daher diese Aktivitäten ebenfalls mit aufgeführt. Aufgrund der katalytischen Eigenschaften des Enzyms wurde das erhaltene Enzym als CO-oxidierender/H<sub>2</sub>-bildender Enzymkomplex bezeichnet. Die katalytischen Eigenschaften werden ausführlich im Kapitel 1.4 beschrieben.

Drei Enzym-Aktivitäten wurden verwendet, um die Hydrogenase, CO-Dehydrogenase und einen möglichen Enzymkomplex aus Hydrogenase und CO-Dehydrogenase (CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplex) zu verfolgen. In allen Reinigungsschritten koeluierten die drei Enzym-Aktivitäten, nur nach der Hydroxyapatit-Säule eluierte eine Fraktion mit CO-Dehydrogenase-Aktivität mit 0.03 M Kalium-Phosphat, während die Fraktion mit Hydrogenase- und CO-Dehydrogenase-Aktivität mit 1 M Kalium-Phosphat eluierte. Eine Fraktion, die nur Hydrogenase-Aktivität enthielt, wurde nicht gefunden.

**Tabelle 6: Reinigung des CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*.** Zellextrakt wurde aus 40 g Feuchtzellen gewonnen und das Enzym wie unter Material und Methoden beschrieben gereinigt. Zur Bestimmung der Hydrogenase- und CO-DH-Aktivität wurde die Reduktion von Methylviologen in einem 800 µl Testansatz (50 mM MOPS/KOH, pH 7,0 + 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid) bei 70°C photometrisch verfolgt. 1 Unit (U) entspricht 2 µmol Methylviologen reduziert pro min. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität des Enzymkomplexes wurde die Bildung von H<sub>2</sub> aus CO gaschromatographisch bestimmt. 1 U entspricht der Bildung von 1 µmol H<sub>2</sub> pro min.

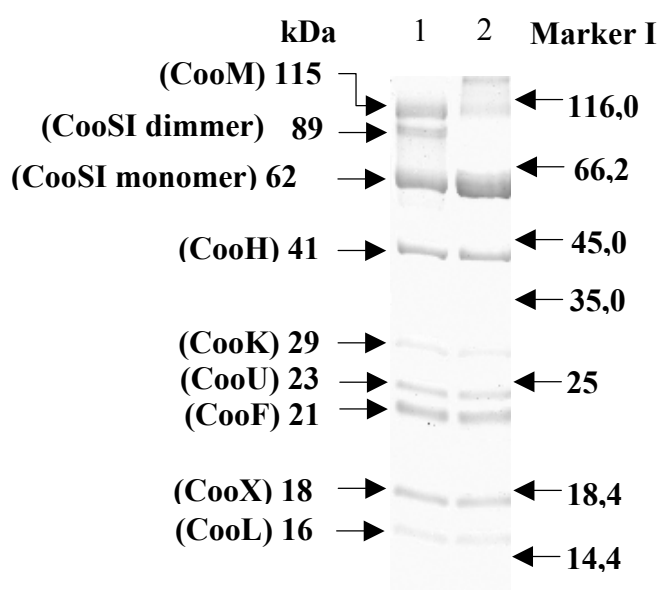
Fraktion	Protein (mg)	Hydrogenase-Aktivität		CO-Dehydrogenase-Aktivität		Komplex-Aktivität	
		(U <sub>ges</sub> )	(U·mg <sup>-1</sup> )	(U <sub>ges</sub> )	(U·mg <sup>-1</sup> )	(U <sub>ges</sub> )	(U·mg <sup>-1</sup> )
Membranfraktion	821	18 061	21	647 610	789	16 145	20
Gewaschene Membranfraktion	493	17 971	36	388 571	788	16 065	33
Solubilisat	462	15 085	33	404 081	874	13 420	29
Q-Sepharose HiLoad	162	10 285	63,5	382 040	2358	8604	53
Hydroxyapatit (1 M Kalium- phosphat Eluat)	88	8080	92	251 428	2857	5720	65
Superdex 200	35	6400	183	207 346	5924	4049	116

## 1.2 Molekulare Eigenschaften eines CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*

### 1.2.1 Untereinheiten-Zusammensetzung des Enzymkomplexes

Die nach den oben beschriebenen Chromatographieschritten erhaltene Enzympräparation wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Die Proteinproben wurden sowohl durch Kochen in einem SDS-Probenpuffer für 5 min als auch durch Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur denaturiert. Die Proteine wurden anschließend in einem 14%igen

Polyacrylamidgel aufgetrennt (**Abb. 8**). Nach anschließender Färbung mit Coomassie Brilliantblau wurden in den nicht gekochten Proben neun Proteinbanden erhalten. Die apparenten molekularen Massen dieser neun Polypeptide wurden durch Vergleich mit Markerproteinen in den SDS-Gelen zu 115, 89, 62, 41, 29, 23, 21, 18 und 16 kDa bestimmt (**Abb 8**). In den gekochten Proben war die 89-kDa-Bande nicht mehr nachweisbar und die Intensität der 62-kDa-Bande nahm zu. Darüber hinaus zeigte sich in den gekochten Proben eine starke Proteinbande an der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel. Die 115 kDa- und die 29-kDa-Bande zeigten eine wesentlich geringere Intensität. Eine Silberfärbung der Gele zeigte keine zusätzlichen Proteinbanden.

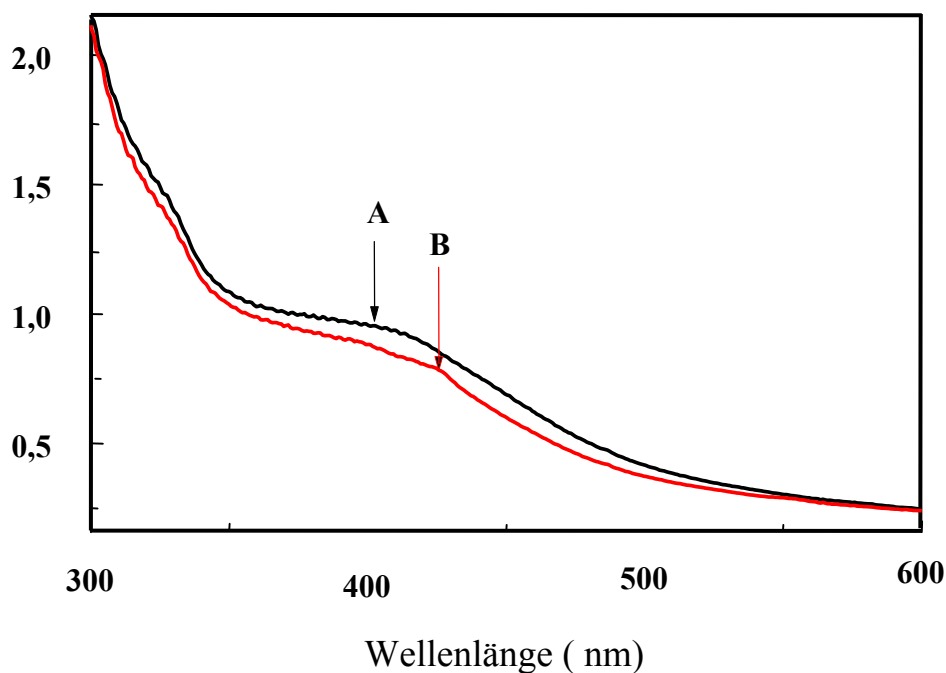


**Abb. 8: SDS-PAGE des gereinigten CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*.** Die Proteine wurden in einem 14%igen Polyacrylamidgel (90 mm x 65 mm x 0,75 mm) aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliantblau. Die Pfeile zeigen die Migrationabstände des Molekularmassenstandards (MBI Fermentas). Die Proteinproben (18 µg) wurden sowohl durch Kochen für 5 min in SDS-Probenpuffer (Spur 1) als auch durch Inkubation in SDS-Probenpuffer für 1 h bei Raumtemperatur denaturiert (Spur 2). Zur Alkylierung wurde die Probe nach Denaturierung 30 min bei Raumtemperatur mit Iodacetamid inkubiert.

### 1.2.2 Cofaktoranalyse und Stöchiometrie der verschiedenen Untereinheiten des Enzymkomplexes.

Die gereinigte Enzympräparation besaß eine tiefe braune Farbe und zeigte Absorptionsmaxima im Bereich zwischen 350 und 500 nm, wie man es typischerweise für Eisen-Schwefel-Proteine findet (**Abb. 9**).





**Abb. 9: Absorptionsspektrum des gereinigten CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*.** Spektrum A zeigt das mit O<sub>2</sub> oxidierte Enzym und Spektrum B das mit Na-Dithionit reduzierte Enzym. Die Lösung enthielt 1,6 mg Protein pro ml in 50 mM MOPS pH 7,0 + 2mM DTT + 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid. Die Spektren wurden unter N<sub>2</sub> als Gasphase aufgenommen.

Eine Bestimmung des Gehalts an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel ergab, dass der Enzymkomplex pro mg Protein etwa 139,5 nmol Fe und 133 nmol säurelabilen Schwefel enthält. Da es sich bei der Hydrogenase um eine [NiFe]-Hydrogenase handelt, und auch alle bisher aus anaeroben Mikroorganismen beschriebenen Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen Ni-Enzyme sind, wurde der Ni-Gehalt der Enzympräparation bestimmt. Hierbei wurde pro mg Protein etwa 6,9 nmol Ni bestimmt. Ausgehend von einer molekularen Masse von 441 kDa (siehe unten) konnten 3 mol Nickel, 59 mol säurelabiler Schwefel und 61,5 mol Nicht-Häm-Eisen pro mol Enzym bestimmt werden. Aus der Primärstruktur kann vorhergesagt werden, dass 1 mol Enzymkomplex 3 mol Nickel, 66 mol säurelabiler Schwefel und 65 mol Nicht-Häm-Eisen enthält.

SDS-PAGE Analysen des gereinigten Enzymkomplexes deuten auf einen höheren Anteil der CO-Dehydrogenase-Untereinheiten (CooS und CooF) im Vergleich zu den Hydrogenase-Untereinheiten hin. Die Quantifizierung der verschiedenen Proteinbanden in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen mit der „ImageQuant“-Software (Molecular Dynamics, Krefeld) ergab, dass die CO-Dehydrogenase-Untereinheiten (CooS und CooF) in einer 2:1-

Stöchiometrie zu den Hydrogenase-Untereinheiten vorlagen. Das gleiche Ergebnis wurde nach Extraktion und Quantifizierung des an die verschiedenen Polypeptide gebundenen Coomassie-Farbstoffs erhalten. Hieraus berechnet sich eine molekulare Masse für den Komplex von 441 kDa.

### **1.3 Bestimmung der aminoterminalen Sequenzen der Untereinheiten des Enzymkomplexes und Identifizierung der kodierenden Gene**

Für sieben der neuen Polypeptide des gereinigten Enzymkomplexes, die in den nicht gekochten Proben nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sichtbar waren, wurden die aminoterminalen Sequenzen bestimmt. Die aminoterminalen Sequenzen für die 115-kDa und 29-kDa Polypeptidbanden konnten nicht bestimmt werden. Interessanterweise waren die erhaltenen aminoterminalen Sequenzen der 89-kDa-Bande und der 62-kDa-Bande identisch. Da die 89-kDa-Bande in gekochten Proben nicht nachweisbar war und die Intensität der 62-kDa-Bande in diesen Proben zunahm, wird vermutet, dass es sich bei der 89-kDa-Bande um ein Dimer des 62-kDa-Proteins handelt, das nach Kochen vollständig in das Monomer übergeht. Es gelang mit Hilfe der erhaltenen Proteinsequenzen, die kodierenden Gene im Genom von *Ca. hydrogenoformans* nachzuweisen. Das Genom von *Ca. hydrogenoformans* wird zur Zeit von der Firma TIGR bestimmt und die vorläufigen Daten sind über die Internetadresse <http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi> abrufbar. In Tabelle 7 sind die durch Edman-Abbau bestimmten aminoterminalen Sequenzen den aus den Genen abgeleiteten Proteinsequenzen gegenübergestellt. Eine Sequenzanalyse der aus den Genen abgeleiteten Proteine zeigt, dass die einzelnen Polypeptide der Enzympräparation eine sehr hohe Sequenzverwandtschaft zu Untereinheiten der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase und zu Untereinheiten der CO-induzierten Hydrogenase aus *Rhodospirillum rubrum* besitzen (Fox et al., 1996). Daher wurde für die Gene/Proteine aus *Ca. hydrogenoformans* die gleiche Nomenklatur gewählt wie in *R. rubrum*. Vier erhaltene aminoterminalen Sequenzen konnten Genen zugeordnet werden, die für die Hydrogenase kodieren. Die abgeleiteten Proteinsequenzen zeigen neben der Sequenzverwandtschaft zu dem Enzym aus *R. rubrum* ebenfalls eine ausgeprägte Sequenzverwandtschaft zur Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* und zu Hydrogenase 3 aus *E. coli*. Diese Enzyme sind aus vier hydrophilen und zwei integralen Membranproteinen aufgebaut. Von der *Ca. hydrogenoformans*-Hydrogenase konnten die

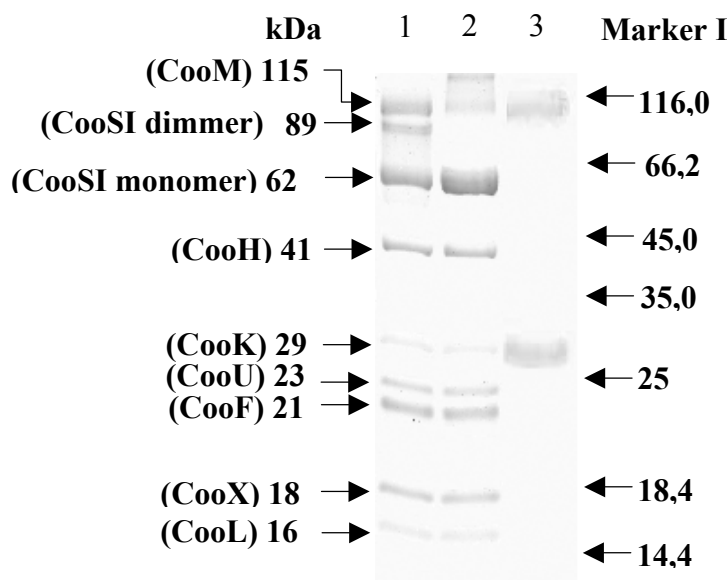
vier hydrophilen Untereinheiten aufgrund ihrer aminoterminalen Sequenzen eindeutig identifiziert werden.

**Tabelle 7: Vergleich der durch Edman-Abbau bestimmten aminoterminalen Sequenzen der Untereinheiten des Enzymkomplexes mit Proteinsequenzen, die aus der Genomsequenz von *Ca. hydrogeniformans* abgeleitet wurden. (-) Aminosäure konnte nicht eindeutig identifiziert werden.**

<b>89-kDa Untereinheit</b>	
Edman-Abbau	NWKNSV-PAV-YLLPIA
Aus dem Genom abgeleitet	NWKNSVDPAVDYLLPIA
<b>62-kDa Untereinheit</b>	
Edman-Abbau	NPKNSVDPAVDYL-PIK-KA-IE
Aus dem Genom abgeleitet	NWKNSVDPAVDYLLPIAKKAGIE
<b>41-kDa Untereinheit</b>	
Edman-Abbau	STYTIPVGPLSVALEEPMYFXVXV
Aus dem Genom abgeleitet	STYTIPVGPLHVALEEPMYFRVEV
<b>23-kDa Untereinheit</b>	
Edman-Abbau	MV-NIQCCFTCKLTRALGACFSL-W
Aus dem Genom abgeleitet	MVRNIQEEFTEKLTRALGAEFSLRW
<b>21-kDa Untereinheit</b>	
Edman-Abbau	-ATA-E-YFIYAD----L--K---IA
Aus dem Genom abgeleitet	MATANENYFIYADPRKCLGCKNCEIA
<b>18-kDa Untereinheit</b>	
Edman-Abbau	FLKIALPNLFKSPTTXPYXF
Aus dem Genom abgeleitet	FLKIALRNLFKSPTTDPYPF
<b>16-kDa Untereinheit</b>	
Edman-Abbau	MKKILQKIAKKSPWLY-INAG
Aus dem Genom abgeleitet	MKKILQKIAKKSPWLYRINAG

CooH ist die „Hydrogenase große Untereinheit“, die das katalytische Zentrum trägt, CooL ist die „Hydrogenase kleine Untereinheit“ mit einem Bindemotiv für [4Fe-4S]-Zentren. CooX kleinen Fe/S-Protein mit zwei Bindemotiven für [4Fe-4S]-Zentren und CooU ist ein kleines hydrophobes Protein. Das putative Hydrogenase-Operon enthält drei weitere Gene, *cooM*, *cooK* und *hypA*.

Das *cooM*-Gen kodiert für ein großes integrales Membranprotein mit einer berechneten molekularen Masse von 136 kDa. Mit dem THMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/>) lassen sich 32 bis 34 Transmembranhelices vorhersagen. Das *cooK*-Gen kodiert für ein zweites kleines integrales Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 34,5 kDa und 8 Transmembranhelices. Möglicherweise handelt es sich bei der 115- und der 29-kDa Bande, deren aminoterminal Sequenz nicht bestimmt werden konnte, um CooM und CooK. Das 115- und das 29-kDa Polypeptid wurden daher zunächst aus dem gereinigten Enzymkomplex mit einem organischen Lösungsmittel (Chloroform/Methanol; 67/33, v/v) extrahiert und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (**Abb 10**). Das Extraktionsexperiment zeigte, dass diese Polypeptide hydrophobe Proteine sind (siehe Material und Methoden).



**Abb. 10: SDS-PAGE der extrahierten 115-kDa und 29-kDa Untereinheiten des CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*.** Die Proteine wurden in einem 14%igen Polyacrylamidgel (90 mm x 65 mm x 0,75 mm) aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliantblau. Die Pfeile zeigen die Migrationsabstände des Molekularmassenstandards (MBI Fermentas). Zur Alkylierung wurde die Probe nach Denaturierung 30 min bei Raumtemperatur mit Iodacetamid inkubiert. Die Proteinproben (18 µg) wurden sowohl durch Kochen für 5 min in SDS-Probenpuffer (Spur 1) als auch durch Inkubation in SDS-Probenpuffer für 1 h bei Raumtemperatur denaturiert (Spur 2). Die 115- und 29-kDa Polypeptide wurden aus 50 µg gereinigtem Enzymkomplex extrahiert (Chloroform/Methanol; 67/33, v/v) und 5 min in SDS-Probenpuffer inkubiert (Spur 3).

Beide Polypeptide wurden im SDS-Gel mit Trypsin oder CNBr verdaut, die erhaltenen Peptide wurden durch MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Die Peptidmassen

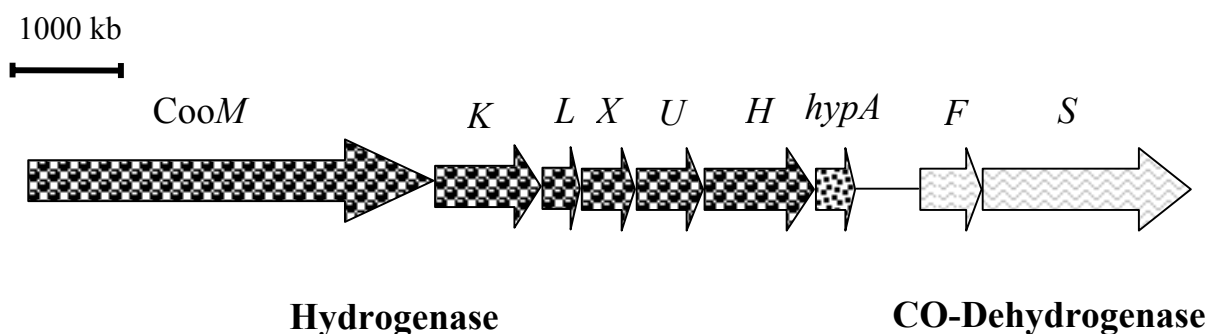
wurden mit den Massen, die durch einen theoretischen Verdau des CooM bzw. CooK Proteins erhalten wurden, verglichen. Ein Trypsin-Verdau des 29-kDa Polypeptids ergab nur 4 Hauptpolypeptide, wovon die Massen von 3 Peptiden mit Massen aus dem theoretischen Verdau identisch waren. Diese Peptide mit den Massen 1557,87 Da (-0,01), 1564,86 Da (-0,01) und 1713,97 Da (-0,005) sind in einer großen hydrophilen Schleife zwischen den Aminosäureresten 28 und 73 lokalisiert. Vermutlich sind die hydrophoben Regionen des Proteins nicht durch die Protease zugänglich. Wegen des niedrigen Methioningehalts des 29-kDa Polypeptids konnte eine CNBr-Spaltung nicht verwendet werden. Die CNBr-Spaltung ist eine geeignete Methode für die Spaltung von integralen Membranproteinen (van Montfort et al., 2002). Die CNBr-Spaltung des 115-kDa Polypeptids ergab 12 Peptide im Massenbereich zwischen 800 und 3000 Da. Die Massenabweichungen der gemessenen Massen von den erwarteten Massen sind in Klammern angegeben (in Da): 1004,3 (-0,07), 1134,54 (0,04), 1440,64 (0,19), 1501,81 (0,09), 1519,77 (0,05), 1568,77 (0,06), 2034,89 (0,08), 2147,07 (0,12), 2307,07 (0,23), 2458,20 (0,18), 2467. Die Massen dieser Peptide stimmen mit den in einer theoretischen CNBr-Spaltung des CooM-Proteins erhaltenen Massen überein.

Die apparente molekulare Masse von CooM und CooK wurde durch SDS/PAGE-Analyse mit 115 kDa bzw. 29 kDa bestimmt. Der relativ große Unterschied zwischen der berechneten molekularen Masse (CooM: 136 kDa und CooK: 34,5 kDa) und der durch SDS/PAGE-Analyse bestimmten apparenten molekularen Masse (115 und 29 kDa) ist auch bei den hydrophoben Untereinheit (EchA und EchB) von Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* beobachtet worden. Die 115- und 29-kDa Proteinbande waren in SDS-Gelen, bei denen die Proben durch Kochen denaturiert wurden, kaum mehr detektierbar. Diese Beobachtung wurde auch für die entsprechende Untereinheit (EchA und EchB) von Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* gemacht (Meuer et al., 1999). Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse konnten das 115-kDa und das 29-kDa Polypeptid als CooM und CooK identifiziert werden.

Die aminoterminalen Sequenz des 89-kDa und des 62-kDa Polypeptids waren identisch (s.o.). Beide Sequenzen konnten einem Gen zugeordnet werden. Die aus dem Gen abgeleitete Proteinsequenz zeigt eine hohe Sequenzverwandtschaft zur katalytischen Untereinheit der CO-Dehydrogenase aus *R. rubrum* (CooS). Bei der 21-kDa Untereinheit

handelt es sich um die kleine Untereinheit (CooF) der CO-Dehydrogenase, wie durch Analyse der aus dem Gen abgeleiteten Gesamtproteinsequenz gezeigt werden konnte.

Mit Hilfe der vorhandenen Genomsequenzdaten wurde die Anordnung der Gene, die für die Hydrogenase und die CO-Dehydrogenase kodieren, bestimmt (**Abb. 11**). Dabei zeigte sich, dass die sechs Hydrogenase-Gene in der Reihenfolge *cooMKLXUH* angeordnet sind. Die gleiche Genanordnung zeigen die Gene, die für die Hydrogenase aus *R. rubrum* kodieren. Dem *cooH*-Gen folgt unmittelbar ein Gen, das für ein Protein mit Sequenzverwandtschaft zu dem HypA-Protein aus *Escherichia coli* und anderen Mikroorganismen kodiert. HypA ist zusammen mit anderen Hyp-Proteinen essentiell für die Assemblierung des [NiFe]-Zentrums in der „Hydrogenase großen Untereinheit“ von [NiFe]-Hydrogenasen (Drapal & Böck, 1998). Unmittelbar auf das *hypA*-Gen folgt in dem *Ca. hydrogenoformans*-Genom eine intergene Region von 116 bp. Darauf folgen die beiden Gene für die CO-Dehydrogenasen (als *cooF* bzw. *cooS* bezeichnet).



**Abb. 11: Anordnung der Gene im Genom von *Ca. hydrogenoformans*, die für den CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplex kodieren.** Nach den bisherigen Genomsequenzdaten bilden die Gene *CooM*, *CooH*, *CooK*, *CooU*, *CooX* und *CooL*, die für die Untereinheiten der Hydrogenase kodieren, ein Gencluster mit dem *hypA* Gen, dessen Genprodukt möglicherweise an der Biosynthese des [NiFe]-Zentrums beteiligt ist. Die Gene *CooS* und *CooF*, die für die Untereinheiten einer Kohlenmonoxid Dehydrogenase kodieren, bilden vermutlich eine eigene Transkriptionseinheit.

#### 1.4 Katalytische Eigenschaften des CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*

##### 1.4.1 Enzymaktivitäten mit Viologenfarbstoffen als Elektronenakzeptoren bzw.-donatoren

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den katalytischen Eigenschaften, die mit Methyl- und Benzylviologen als Elektronendonator oder -akzeptor ermittelt wurden. Da der

Enzymkomplex aus Hydrogenase und CO-Dehydrogenase besteht, wurden die Aktivitäten beider Enzyme zunächst separat bestimmt.

Der Enzymkomplex katalysierte die Wasserstoffaufnahme und die damit verbundene Reduktion von Methylviologen (MV) unter Standardtestbedingungen mit einer spezifischen Aktivität von  $180 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ . Die Rückreaktion, die Bildung von  $\text{H}_2$  aus reduziertem Methylviologen, wurde mit spezifischen Aktivitäten von durchschnittlich  $170 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  katalysiert. Unter diesen Standard-Testbedingungen waren die Aktivitäten der  $\text{H}_2$ -Bildung der  $\text{H}_2$ -Aufnahme also etwa gleich. Ebenfalls katalysierte diese Präparation die Reduktion von Methylviologen mit Kohlenmonoxid als Substrat mit einer spezifischen Aktivität von  $5900 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  unter den Standardtestbedingungen.

#### **1.4.2 Umsetzung von CO zu $\text{CO}_2$ und $\text{H}_2$ durch CO-oxidierenden/ $\text{H}_2$ -bildenden Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans***

Um festzustellen, ob in dem Enzymkomplex ein Elektronentransfer zwischen dem aktiven Zentrum der Hydrogenase und dem aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase stattfindet, wurde getestet, ob der Enzymkomplex die Umsetzung von CO zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  katalysiert. Mit 100% CO in der Gasphase katalysierte der gereinigte Enzymkomplex die Bildung von  $\text{H}_2$  mit einer spezifischen Aktivität von  $120 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  bei pH 7,0. Mit 5% CO in der Gasphase betrug die Aktivität  $450 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  bei pH 7,0. Mit steigender Proteinkonzentration wurde ein linearer Anstieg der  $\text{H}_2$ -Bildungsraten erhalten. Diese Linearität trat sogar bei sehr niedriger Proteinkonzentration auf ( $45 \text{ µg/ml}$  im Test; entspricht einer Konzentration des Enzymkomplexes von  $0.1 \text{ µM}$ ).

Die Raten der  $\text{H}_2$ -Bildung mit CO als Elektronendonator und mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator zeigten die gleiche pH-Abhängigkeit. Das pH-Optimum lag bei 6,5.

#### **1.4.3 Redox-abhängige Aktivierung des Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans***

Für CO-Dehydrogenase von *R. rubrum* wurde gefunden, dass das Enzym bei einem Redox-Potential höher als  $-300 \text{ mV}$  inaktiv ist. Das Enzym kann durch starke Reduktionsmittel oder durch Inkubation mit CO wieder aktiviert werden. Dieser Aktivierungsprozess ist von der CO-Konzentration und der Inkubationszeit abhängig (Heo

et al., 2001). Die Aktivität des CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans* nahm mit steigender CO-Konzentration zu. Maximale Aktivität wurde mit etwa 40% CO in der Gasphase (250 µM CO in Lösung bei 70°C ) erhalten. **Abb 12A** zeigt die Abhängigkeit der CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzym-Aktivität von der CO-Konzentration. Da der  $K_M$ -Wert der gereinigten CO-Dehydrogenase aus *Ca. hydrogenoformans* für CO etwa 18 µM beträgt (Svetlichnyi et al., 2001), wurde erwartet, dass die maximale H<sub>2</sub>-Bildung mit CO als Elektronendonator bei sehr geringeren CO-Konzentration (<100 µM) erreicht wird. Bei höheren CO-Konzentrationen wurde eine Hemmung der Hydrogenase im Enzymkomplex durch CO erwartet (s. u.).

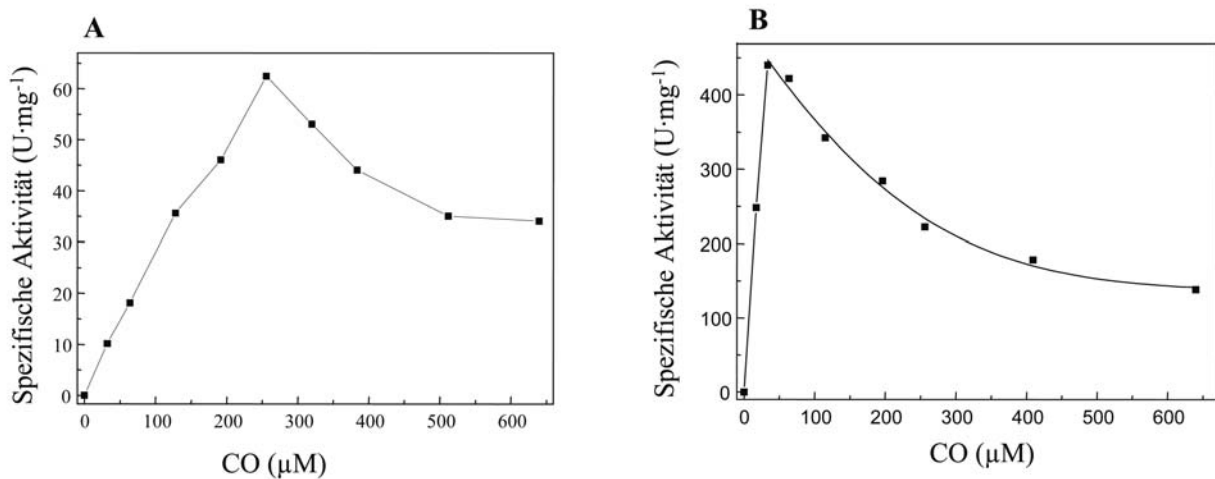
Die Tatsache, dass die maximale Aktivität des Enzymes nur bei recht hohen CO-Konzentrationen zu beobachten war, zeigt, dass CO-Dehydrogenase im Enzymkomplex durch CO aktiviert wird. Daher wurde versucht, den Enzymkomplex auch unabhängig von CO durch Zugabe von Ti(III)Citrat zu aktivieren. Ti(III)Citrat ist ein starkes Reduktionsmittel und wurde bereits erfolgreich verwendet, um andere Redox-Enzyme, die niedrige Redox-Potential haben, zu aktivieren (Heo et al., 2001). Inkubation des Enzymkomplexes in Anwesenheit von 1 mM Ti(III)Citrat für 1 min bei 65°C ergab eine Zunahme der Aktivität bereits bei niedrigen CO-Konzentrationen. Unter diesen Bedingungen wurde eine maximale Aktivität bereits mit 5% CO in der Gasphase (31 µM CO in Lösung bei 65°C) erreicht. Die Aktivität des Enzymkomplexes nahm durch Aktivierung mit Ti(III)Citrat etwa 45-fach zu (**Abb.12B**).

Im allgemeinen war die Stärke der Aktivierung abhängig von der verwendeten Enzympräparation. Eine frisch vorbereitete Enzympräparation zeigte eine höhere spezifische Aktivität und konnte daher nur in einem niedrigeren Umfang im Vergleich zu einer älteren Enzympräparation aktiviert werden.

Um festzustellen, ob Ti(III)Citrat die CO-Dehydrogenase, die Hydrogenase oder beide Enzyme im Enzymkomplex aktiviert, wurde der Einfluss von Ti(III)Citrat auf die Aktivität von CO-Dehydrogenase und Hydrogenase individuell getestet. In diesen Enzymassays wurde Metylenblau anstelle vom Methylviologen als Elektronenakzeptor verwendet, da reduziertes Methylviologen selbst ein starkes Reduktionsmittel ist, das das Enzym aktivieren könnte. Es wurde festgestellt, dass die Vorinkubation des Enzymkomplexes mit Ti(III)Citrat keinen Einfluss auf die Rate der Metylenblau-Reduktion mit H<sub>2</sub> als



Elektronendonator hat. Die spezifische Aktivität betrug  $30 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ . Jedoch nahm die Rate der Methylenblau-Reduktion mit CO als Elektronendonator um einen Faktor von 21 zu. Die maximale spezifische Aktivität betrug  $1500 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ .

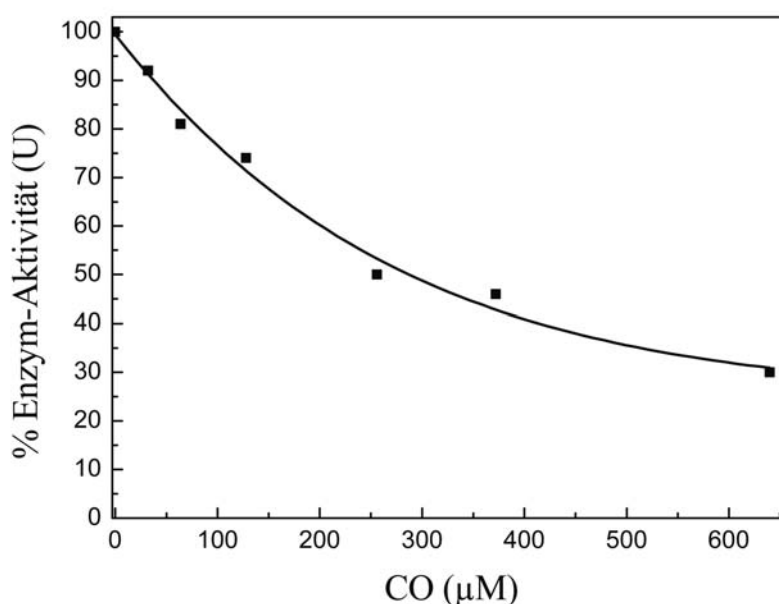


**Abb. 12: Abhängigkeit der Aktivität der CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplex-Aktivität von der CO-Konzentration.** Die 1 ml Testansätze (in anaeroben verschlossenen 8 ml Serumflaschen bei 70°C) enthielten 50 mM MOPS/KOH pH 7,0 + 2 mM Detergens, 45 μg gereinigten Enzymkomplex. Der Einfluss von CO auf die H<sub>2</sub>-Bildungsaktivität des Enzymkomplexes konnte durch die Bestimmung der H<sub>2</sub>-Konzentration in der Gasphase mittels Gaschromatographie verfolgt werden. Auf die Testansätze unter ( $1,2 \times 10^5$  Pa) N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurde anschließend eine definierte Menge von Kohlenmonoxid gegeben, so dass die CO-Konzentrationen in der Gasphase von 0 -100% variiert wurde, was einer CO-Konzentration in der Lösung von 0 bis 640 μM entspricht. Die Testansätze wurden mit einem Magnetrührer stark gerührt. In Zeitabständen von 1,5 min wurden mit einer gasdichten Spritze Proben aus der Gasphase der Testansätze entnommen und der H<sub>2</sub>-Gehalt bestimmt (1 U entspricht der Reduktion von 2 μmol Protonen zu 1 μmol H<sub>2</sub> pro min). **(A)** Keine Vorinkubation des Enzymkomplexes mit Ti(III)Citrat. **(B)** Der Enzymkomplex wurde mit 1 mM Ti(III)Citrat vorinkubiert, außerdem enthielt der Testansatz 1 mM Ti(III)Citrat. Kontrollexperimente in Abwesenheit von CO zeigten, dass der Enzymkomplex nur sehr geringe H<sub>2</sub>-Bildungsaktivität mit Ti(III)citrat als Elektronendonator besitzt.

#### 1.4.4 Hemmung der Hydrogenase im Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans* durch Kohlenmonoxid

Die meisten bisher untersuchten [NiFe]-Hydrogenasen wurden durch CO gehemmt, wobei CO als kompetitiver Inhibitor fungiert (Fox et al., 1996). Um zu überprüfen, ob die Hydrogenase im CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Komplex von *Ca. hydrogenoformans* durch CO gehemmt wird, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt. Zunächst sollte der Einfluss von CO auf die H<sub>2</sub>-Bildungsaktivitäten mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator getestet werden. Aufgrund der sehr hohen CO-Dehydrogenase-Aktivität

des Enzymkomplexes wurde CO, das in dem Test als möglicher Inhibitor eingesetzt wurde, jedoch sofort zu CO<sub>2</sub> umgesetzt, was an der Reduktion von Methylviologen erkennbar wurde. Es war deswegen notwendig, die CO-Dehydrogenase im Enzymkomplex zu hemmen. Dieses wurde mit 3 mM Kaliumcyanid erreicht. Kaliumcyanid ist ein starker Inhibitor der CO-Dehydrogenase, aber nicht der Hydrogenase (Ensign et al., 1989). Die Hemmungskurve zeigt, dass eine 50%ige Hemmung der Hydrogenase mit 45% CO in der Gasphase (entspricht ~300 µM CO in Lösung bei 70°C) erreicht wurde (**Abb. 13**).

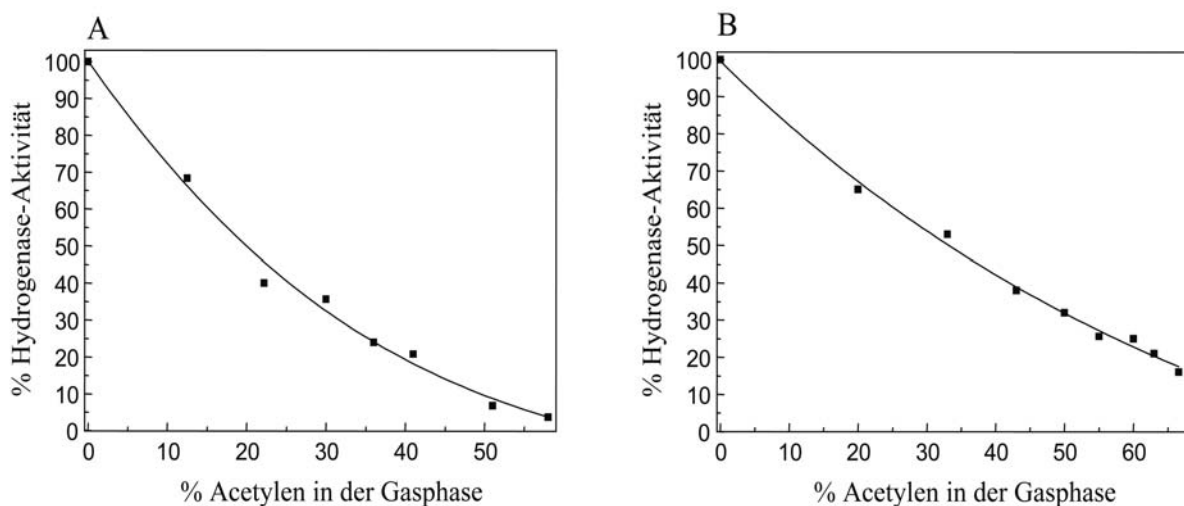


**Abb. 13: Hemmung der Hydrogenase im Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans* durch Kohlenmonoxid.** Die 1 ml Testansätze enthielten 50 mM MOPS/KOH pH 7,0 + 2 mM Detergens, 2 mM reduziertes Methylviologen, 0,8 mM Natriumdithionit, 3 mM Kaliumcyanid sowie 40 µg gereinigter Enzymkomplex. Der Einfluss von CO auf die H<sub>2</sub>-Bildungsaktivität von Hydrogenase im Enzymkomplex konnte durch die Bestimmung der H<sub>2</sub>-Konzentration in der Gasphase mittels Gaschromatographie verfolgt werden. H<sub>2</sub>-Bildungs-Aktivitäten wurden in anaerob verschlossenen 8 ml Serumflaschen bei 70°C bestimmt. Auf die Testansätze unter N<sub>2</sub> (1,2x10<sup>5</sup> Pa) wurde anschließend eine definierte Menge von Kohlenmonoxid gegeben, so dass die CO-Konzentrationen in der Gasphase von 0-100% variiert wurden, was einer CO-Konzentration von 0-bis 640 µM in Lösung entspricht. Die Testansätze wurden mit einem Magnetrührer stark gerührt. In Zeitabständen von 1 min wurden mit einer gasdichten Spritze Proben aus der Gasphase der Testansätze entnommen und der H<sub>2</sub>-Gehalt bestimmt (1 U entspricht der Reduktion von 2 µmol Protonen zu 1 µmol H<sub>2</sub> pro min). Die CO-Konzentration, bei der die Aktivität auf 50% der Ausgangsaktivität reduziert wurde, betrug 300 µM.

Ein ähnlicher Wert (50% Hemmung bei 300 µM CO) wurde für CO-induzierte Hydrogenase aus *R. rubrum* bestimmt (Fox et al., 1996). Somit ist die Hemmung beider Hydrogenasen durch CO recht gering im Vergleich zu den meisten anderen [NiFe]-Hydrogenasen. Normalerweise wird eine 50%ige Hemmung von [NiFe]-Hydrogenasen durch CO-Konzentrationen von ~40 µM beobachtet.

### 1.4.5 Hemmung der Hydrogenase im Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans* durch Acetylen

H<sub>2</sub>-Bildung mit reduziertem Methylviologen (**Abb. 14A**) oder mit CO als Elektronendonator (**Abb. 14B**) wurde durch Acetylen gehemmt. Eine 50%ige Hemmung wurde mit 20 bis 30% Acetylen in der Gasphase beobachtet. Die Reduktion von Methylviologen durch CO wurde nicht durch Acetylen gehemmt.

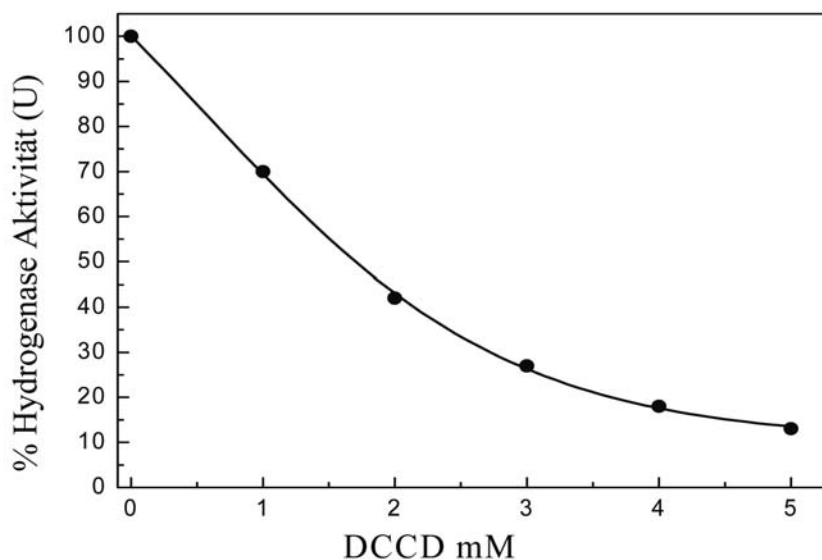


**Abb. 14: Hemmung der Hydrogenase im Enzymkomplex durch Acetylen.** Die 1 ml Testansätze (in anaeroben verschlossenen 8 ml Serumflaschen bei 70°C) enthielten 50 mM MOPS/KOH pH 7,0 + 2 mM Detergens, 45 µg gereinigter Enzymkomplex. Der Einfluss von Acetylen auf die H<sub>2</sub>-Bildungsaktivität von Hydrogenase im Enzymkomplex konnte durch die Bestimmung der H<sub>2</sub>-Konzentration in der Gasphase mittels Gaschromatographie verfolgt werden. Testansätze wurden mit einem Magnetrührer stark gerührt. In Zeitabständen von 1 min wurden mit einer gasdichten Spritze Proben aus der Gasphase der Testansätze entnommen und der H<sub>2</sub>-Gehalt bestimmt (**A**). Die Testansätze zur Bestimmung der H<sub>2</sub>-Bildung mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator enthielten 2 mM reduziertes Methylviologen und 0,8 mM Natriumdithionit. Auf die Testansätze unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre (1,2x10<sup>5</sup> Pa) wurde eine definierte Menge von Acetylen gegeben, so dass die Acetylen-Konzentrationen in der Gasphase von 0-58% variierte (**B**). Die Testansätze zur Bestimmung der H<sub>2</sub>-Bildung mit CO als Elektronendonator enthielten 33% CO in der Gasphase. Hierzu wurden definierte Mengen von Acetylen gegeben, so dass die Acetylen-Konzentration in der Gasphase von 0-66% variierte. 1 U entspricht der Bildung von 1 µmol H<sub>2</sub> pro min.

### 1.4.6 Hemmung des Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans* durch DCCD

*N,N'*-Dicyclohexyl-Carbodiimid (DCCD) ist ein Carboxylgruppen-modifizierendes Reagenz, das spezifisch an saure Gruppen von Aminosäuren in hydrophober Umgebung bindet. Liegen diese Aminosäurereste in Protonenkanälen der hydrophoben Untereinheiten

Protonen-translozierender Proteine, so werden diese Kanäle durch die kovalente Modifikation durch DCCD blockiert und damit möglicherweise auch die eigentliche Aktivität der entsprechenden Enzyme. DCCD wurde bereits als Inhibitor für die Komplexe I, III, IV und V (ATP-Synthase) der mitochondrialen Atmungskette eingesetzt (Puttner et al., 1983; Yagi & Hatefi, 1988). Auch die H<sub>2</sub>-Bildung aus reduziertem MV durch CO-induzierte Hydrogenase aus *R. rubrum* (Fox et al., 1996a), „Membrane-bound-hydrogenase“ (Mbh) aus *Pyrococcus furiosus* (Silva et al., 2000), *E. coli*-Hydrogenase-3 (Forzi, 2001) wurden durch diese Substanz gehemmt. Für alle diese Hydrogenasen wird eine Protonen-translozierende Funktion postuliert. Der Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans* wurde ebenfalls auf Hemmbarkeit durch DCCD getestet. Hierzu wurde gereinigter Enzymkomplex in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen DCCD bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die H<sub>2</sub>-Bildung mit 5% CO als Elektronendonator bestimmt (**Abb. 15**). Die Rate der H<sub>2</sub>-Bildung nahm durch Inkubation mit steigenden Konzentrationen an DCCD ab. Auch die Dauer der Inkubation wirkte sich schon bei geringeren Mengen an DCCD negativ auf die Aktivität aus. Die Inkubation mit 5 mM DCCD für 120 min führte zu einem 84%igen Verlust der Enzymaktivität.



**Abb. 15: Hemmung der Aktivität des Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans* durch DCCD.** 200 µg Enzymkomplex (1.6 mg Protein/ml) in 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM DTT, 2 mM Dodecyl-β-D-Maltosid wurden mit je 0 mM, 1 mM, 2 mM und 3 mM 4 mM und 5 mM DCCD (20 mM Stammlösung in 96% Ethanol) versetzt und bei Raumtemperatur unter einer CO/N<sub>2</sub> (5/95%) Atmosphäre inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurde die Aktivität des Enzymkomplexes (H<sub>2</sub>-Bildung mittels GC) bestimmt. Kontrollansätze ohne DCCD enthielten entsprechende Konzentrationen an Ethanol. Die Ausgangsaktivität betrug 30 U (mg Protein)<sup>-1</sup>. 1 U Enzymaktivität entspricht der Bildung von 1 µmol H<sub>2</sub>·min<sup>-1</sup>.

## **2. Isolierung und Charakterisierung einer membrangebundenen Ferredoxin-abhängigen [NiFe]-Hydrogenase aus *Thermoanaerobacter tengcongensis***

Das Genom von *Ta. tengcongensis* kodiert für eine Hydrogenase, mit einer hohen Sequenzidentität zu Ech-Hydrogenase aus *Ms. Barkeri* (Bao et al., 2002). Es wurde zunächst versucht, dieses Enzym nachzuweisen, indem Ferredoxin-abhängige Hydrogenase-Aktivität in Zellextrakten, der Membranfraktion und der löslichen Fraktion bestimmt wurde. Hierzu wurde zunächst ein aus *Ms. barkeri* gereinigtes Ferredoxin als Substrat verwendet. Zellextrakte katalysierten die H<sub>2</sub>-abhängige Reduktion des Ferredoxins mit einer Rate von 0,2 U (mg Protein)<sup>-1</sup>. Diese Aktivität wurde nach Fraktionierung fast ausschließlich in der Membranfraktion gefunden.

### **2.1 Reinigung einer membrangebundenen Ferredoxin-abhängigen [NiFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis***

Zur weiteren Reinigung dieser membrangebundenen Hydrogenase wurde standardmäßig die H<sub>2</sub>-abhängige Reduktion von Methylviologen und die Ferredoxin- und H<sub>2</sub>-abhängige Reduktion von Metronidazol verfolgt (Tabelle 8). Für diese Versuche wurde ein aus *Ta. tengcongensis* isoliertes Ferredoxin als Substrat verwendet. Das Enzym konnte durch Verwendung von Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid als Detergenz ohne Verlust der Aktivität solubilisiert werden. Die Reinigung des solubilisierten Enzyms erfolgte zunächst mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose HiLoad, an Hydroxyapatit und Gel-Filtrationschromatographie an Superdex 200 (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Reinigung von Ech-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis*.** Das Enzym wurde wie unter Material und Methoden beschrieben ausgehend von 40 g Feuchtzellen (3200 mg Protein) gereinigt. Zur Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität wurde die Reduktion von Methylviologen in einem 800  $\mu$ l Testansatz (50 mM MOPS/KOH, pH 7,0 + 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid) bei 75°C photometrisch verfolgt. 1 Unit (U) entspricht der Reduktion von 2  $\mu$ mol Methylviologen pro min. Die Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  wurde anhand der anschließenden Reduktion von Metronidazol bei 320 nm photometrisch verfolgt ( $\epsilon_{320} = 9,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Der 0,8 ml Testansatz enthielt 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM DTT, 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid, 20  $\mu$ M Ferredoxin und 0,2 mM Metronidazol. Die Gasphase war 100%  $H_2$  bei ( $1,2 \times 10^5 \text{ Pa}$ ). 1 U Enzymaktivität entspricht der Oxidation von 1  $\mu$ mol  $H_2 \cdot \text{min}^{-1}$  (äquivalent zu der Reduktion von 1/3  $\mu$ mol Metronidazol).

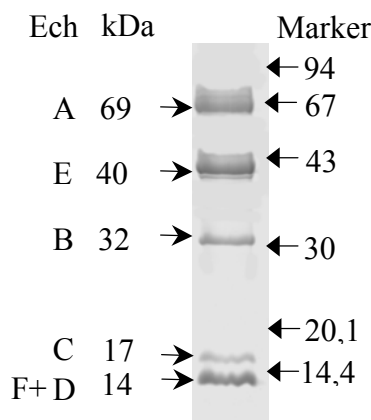
Fraktion	Protein (mg)	Hydrogenase-Aktivität MV		Hydrogenase-Aktivität Fd	
		U <sub>ges</sub>		U <sub>ges</sub>	
		(U mg <sup>-1</sup> )		(U mg <sup>-1</sup> )	
Membranfraktion	1050	4761	4,5	451	0,42
Solubilisat	1000	4224	4,2	445	0,44
Q-Sepharose Hi Load	120	2204	18,3	232	1,93
Hydroxyapatit	4,5	918	167	133	29,5
Superdex 200	1,4	548	380	54	38,5

## 2.2 Molekulare Eigenschaften von Ferredoxin-abhängiger [NiFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis*

**Abb. 16** zeigt eine SDS/PAGE-Analyse der Enzympräparation, die nach der oben beschriebenen Reinigungsprozedur erhalten wurde. Die Präparation enthielt fünf Polypeptide mit den apparenten molekularen Massen von 69, 40, 32, 17 und 14 kDa.

Das Enzym wurde auf seinen Nickel-Gehalt untersucht. Pro mg Protein enthielt das Enzym 4,8 nmol Ni. Ausgehend von einer molekularen Masse von 187,7 kDa (siehe unten) konnten somit 0,9 mol Nickel pro mol Enzym bestimmt werden; erwartet wurde 1 mol Nickel pro mol Enzym (siehe unten). Die gereinigte Enzympräparation besaß eine braune

Farbe. Eine UV/Vis-spektroskopische Analyse des Enzyms zeigte Absorptionsmaxima im Bereich zwischen 350 und 500 nm, wie man es typischer Weise für Eisen-Schwefel-Proteine findet.



**Abb. 16: SDS/PAGE-Analyse von gereinigter [NiFe]-Hydrogenase aus *Ta. Tengcongensis*.** Die Proteine wurden in einem 14%igen Polyacrylamidgel (90 mm x 65 mm x 0,75 mm) aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliantblau. Die Proteinproben (10 µg) wurden durch Inkubation in SDS-Probenpuffer für 1 h bei Raumtemperatur denaturiert. Zur Alkylierung wurde die Probe 30 min nach Denaturierung bei Raumtemperatur mit Iodacetamid inkubiert. Die Pfeile auf der rechten Seite zeigen die Migrationabstände des Molekularmassenstandards (Amersham Biosciences). Die apparenten molekularen Massen der fünf Untereinheiten sind: 69 kDa (EchA), 40 kDa (EchE), 32 kDa (EchB), 17 kDa (EchC), und 14 kDa (eine Mischung von zwei Polypeptiden EchF und EchD).

### 2.3 Bestimmung der aminoterminalen Sequenzen der Untereinheiten von Ferredoxin-abhängiger [NiFe]-Hydrogenase aus *Ta. Tengcongensis* und Identifizierung der kodierenden Gene

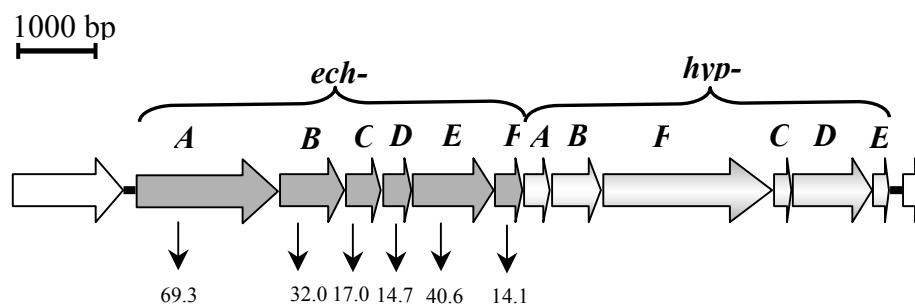
Die aminoterminalen Sequenzen der 40-kDa und der 14-kDa Polypeptide wurden bestimmt. Für die 14-kDa Proteinbande wurden zwei Proteinsequenzen erhalten. Es handelt sich um zwei Polypeptide mit berechneten molekularen Massen von 14,7 und 14,1 kDa (abgeleitet aus der Nukleotidsequenz, siehe unten). Mit Hilfe der drei erhaltenen aminoterminalen Sequenzen konnten die kodierenden Gene identifiziert werden. In Tabelle 9 sind durch die Edman-Abbau bestimmten aminoterminalen Sequenzen den aus den Genen abgeleiteten Sequenzen gegenübergestellt. Somit konnte ein Hydrogenase-Gen-Cluster identifiziert werden, das aus sechs Genen besteht (**Abb. 17**). Die abgeleiteten Proteine besitzen molekulare Massen von 69,3 (EchA), 40,6 (EchE), 32 (EchB), 17,0 (EchC), 14,7 (EchF) und 14,1 (EchD) kDa. Somit lässt sich für das Enzym eine gesamte

molekulare Masse von 187,7 kDa berechnen, wobei von einem 1:1:1:1:1:1Verhältniss der sechs Untereinheiten ausgegangen wurde.

**Tabelle 9: Vergleich der durch Edman-Abbau bestimmten aminoterminalen Sequenzen der 40-kDa und der 14-kDa Untereinheiten der membrangebundenen Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis* mit Proteinsequenzen, die aus der Genomsequenz von *Ta. tengcongensis* abgeleitet wurden.**

<b>40-kDa Polypeptid (EchE)</b> Edman-Abbau Aus dem Genom abgeleitet	MSEKSTIPFGPQHVPVLEPEIH MSEKSTIPFGPQHVPVLEPEIH
<b>14-kDa Polypeptid</b> Edman-Abbau Aus dem Genom abgeleitet ( <b>EchD</b> ) Aus dem Genom abgeleitet ( <b>EchF</b> )	MM IL KS TM RT EK VN KV LV EY EN VL ET KH EK AP KK YT YR YR M I K T R E V K L E E V E K E A K Y Y Y M L S M T K N V V Y N L T H K P K T R R

Eine Sequenzanalyse der aus den Genen abgeleiteten Proteinsequenzen zeigt, dass die einzelnen Polypeptide des Enzyms eine sehr hohe Sequenzverwandtschaft zu Untereinheiten verschiedener membrangebundener [NiFe]-Hydrogenasen besitzen (Tabelle 10). Die höchste Sequenzverwandtschaft besteht zu Ech Hydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* (Künkel et al., 1998). Daher wurde für das Enzym aus *Ta. tengcongensis* ebenfalls als Ech-Hydrogenase bezeichnet.



**Abb. 17: Anordnung der Gene im Genom von *Ta. tengcongensis*, die für die Ech-Hydrogenase und Hydrogenase-Maturationfaktoren kodieren.** Die Gene *echABCDEF* kodieren für die Untereinheiten der Hydrogenase, die Gene *hypABFCDE* kodieren Proteine, die an der Biosynthese des [NiFe]-Zentrums beteiligt sind. Die *ech*- und *hyp*-Gene sind alle in einer Richtung orientiert und nur durch einige Basenpaare voneinander getrennt (<10 bp) oder überlappen.



**Tabelle 10: Sequenzverwandtschaft zwischen den membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase-Untereinheiten aus *Ta. tengcongensis* (diese Arbeit), *Ms. barkeri* (Küinkel et al., 1998), *Ca. hydrogenoformans* (diese Arbeit), und *E. coli* (Hyc) (Böhm et al., 1990) sowie NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) von *E. coli* (Weidner et al., 1993). Zahlen in Klammern sind Sequenzidentitäten zu den Ech-Proteinen aus *Ta. tengcongensis*.**

Ech-UE <i>Ta. Tengcongensis</i>	Eigenschaften der UE	Ech-UE <i>Ms. barkeri</i>	Coo-UE <i>Ca. hydrogenoformans</i>	Hyc-UE <i>E. coli</i>	Nuo-UE ( <i>E. coli</i> , KomplexI)
EchA	Membranproten	EchA (32%)	CooM (29%)	HycC (28,7%)	NuoL (26,8%)
EchB	Membranproten	EchB (29,3%)	CooK (28,3%)	HycD (26,1%)	NuoH (25,1%)
EchC	„Hydrogenase kleine UE“	EchC (55,6%)	CooL (46,2%)	HycG (38%)	NuoB (37%)
EchD	Hydrophiles Protein	EchD (40%)	CooU (38,3%)	HycE (22%) N-term.	NuoC (24,2%)
EchE	„Hydrogenase große UE“	EchE (57,4%)	CooH (47%)	HycE (34,3%)	NuoD (31%)
EchF	2[4Fe-4S] Protein	EchF (42,3%)	CooX (26,4%)	HycF (34,3%)	NuoI (31,4%)

**EchA** ist ein großes hydrophobes Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 69,3 kDa. Mit entsprechenden Programmen zur Vorhersage von Transmembranhelices wurden 16 Transmembranhelices berechnet (siehe Material und Methoden).

**EchB** ist ein kleines hydrophobes Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 32,0 kDa. Für dieses Protein wurden 7 Transmembranhelices vorhergesagt.

**(EchC)** ist die in allen [NiFe]-Hydrogenasen konservierte “Hydrogenase kleine Untereinheit,. In Energie-konvertierenden [NiFe]-Hydrogenasen besitzt diese Untereinheit jedoch nur eine molekulare Masse von etwa 17 kDa im Vergleich zu etwa 40 kDa in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen und enthält nur die Cystein-Liganden für ein einziges, das sogenannte proximale [4Fe-4S]-Zentrum.

**EchD** ist ein hydrophobes Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 14,7 kDa. Das Protein zeigt keine Bindemotive für bekannte prosthetische Gruppen.

**(EchE)** ist die in allen [NiFe]-Hydrogenasen konservierte “Hydrogenase große Untereinheit,,. Dieses hydrophile Protein besitzt eine berechnete molekulare Masse von 40,6 kDa und enthält vier hoch konservierte Cysteinreste, die als Liganden für das bimetallische [NiFe]-Zentrum fungieren. Die „Hydrogenase große Untereinheit“ der meisten [NiFe]-Hydrogenasen trägt eine C-terminalen Verlängerung von etwa 32 Aminosäuren. Die Abspaltung dieser C-terminale Sequenz ist für den Einbau des Nickels in die große Untereinheit notwendig (Maier et al., 1996; Rossmann et al., 1994). Weder EchE aus *Ms. barkeri* und *Ta. tengcongensis* noch die Untereinheit CooH der in Kapitel 1.3 beschriebenen Hydrogenase aus *Ca. hydrogeniformans* verfügen über eine solche C-terminale Extension.

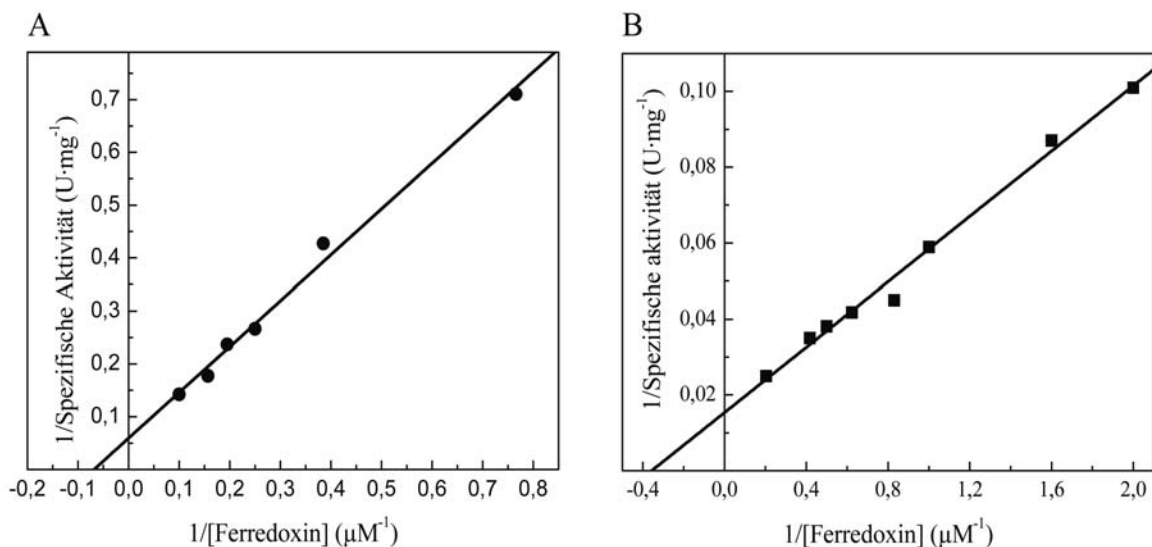
**EchF** ist ein kleines hydrophiles Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 14,1 kDa. EchF enthält Bindemotive für zwei [4Fe-4S]-Zentren.

Das **echF**-Gen wird unmittelbar von einem zweiten Gen-Cluster *hypABFCDE* gefolgt, das für Proteine kodiert, die essentiell für die Biosynthese von [NiFe]-Hydrogenase sind (Blokesch et al., 2002).

## 2.4 Katalytische Eigenschaften von Ech-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis*

Wie alle [NiFe]-Hydrogenasen katalysiert das Enzym die Reduktion von Methylviologen mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator. Die spezifische Aktivität betrug etwa 380 U (mgProtein)<sup>-1</sup>. Die Rückreaktion, die Bildung von H<sub>2</sub> aus reduziertem Methylviologen, wurde mit spezifischen Aktivitäten von durchschnittlich 1260 U (mg Protein)<sup>-1</sup> (pH 7,0, 70°C, 4 mM MV, davon etwa 0,4 mM reduziert) katalysiert. Unter diesen Standard-Testbedingungen waren die Aktivitäten der H<sub>2</sub>-Bildung mit Methylviologen als Elektronendonator mehr als 3-fach höher als die H<sub>2</sub>-Aufnahme mit reduziertem Methylviologen. Auf der Suche nach dem physiologischen Substrat wurde gefunden, dass Ech-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis* in der Lage ist, die durch die Spaltung von H<sub>2</sub> frei werdenden Elektronen auf ein aus *Ta. tengcongensis* gereinigtes Ferredoxin (siehe 3.6) zu übertragen. Das Enzym katalysiert darüber hinaus die Bildung von H<sub>2</sub> mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator. Für die Ermittlung des apparenten *K<sub>M</sub>*-Wertes für die reduzierte und die oxidierte Form des Ferredoxins wurden die Tests wie in MATERIAL & METHODEN unter 3.7 beschrieben durchgeführt (**Abb. 18**). zeigt eine doppelt-reziproke Auftragung der

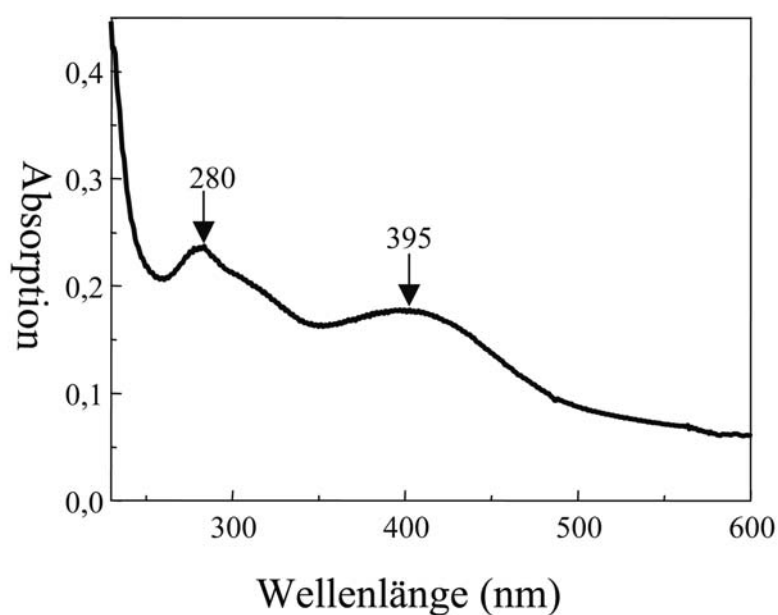
spezifischen Enzym-Aktivität gegen die Konzentration an reduziertem Ferredoxin nach Lineweaver-Burk. Aus dieser Auftragung konnte ein apparenter  $K_M$ -Wert von 3  $\mu\text{M}$  und eine maximale Umsatzrate von 200 U (mg Protein) $^{-1}$  ermittelt werden, wobei 1 U der Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  Wasserstoff pro min entspricht. Diese Werte für die Oxidation von Ferredoxin unterscheiden sich von denen für die Ferredoxin-Reduktion mit Wasserstoff (app.  $K_M = 15 \mu\text{M}$ ;  $V_{\text{max}} = 70 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ ). Ausgehend von diesen Werten und unter Berücksichtigung einer molekularen Masse von Ech-Hydrogenase von 187,7 kDa kann die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) des Enzyms in beide Richtungen ( $\text{H}_2$ -Bildung und -Aufnahme) berechnet werden. Sie liegt bei  $1,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die Ferredoxin-Reduktion mit  $\text{H}_2$  und bei  $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die  $\text{H}_2$ -Bildung mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator. Die  $\text{H}_2$ -Bildung wird damit *in vitro* etwa dreizehnfach effizienter katalysiert als die  $\text{H}_2$ -Aufnahme. Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten aufgrund der hohen katalytischen Effizienz stark auf das Ferredoxin aus *Ta. tengcongensis* als physiologisches Substrat von Ech-Hydrogenase hin.



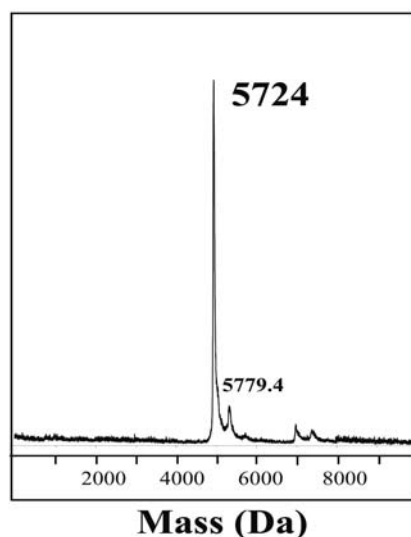
**Abb. 18: Abhängigkeit der Ech-Hydrogenase-Aktivität von der Konzentration an reduziertem- bzw. oxidiertem Ferredoxin dargestellt in doppelt-reziproker Auftragung nach Lineweaver-Burk. A:** Gemessen wurde die Reduktion von Metronidazol mit  $\text{H}_2$ . Die 0,8 ml-Testansätze enthielten 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM DTT, 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid, 0,2 mM Metronidazol sowie 0,5 mU Ech-Hydrogenase und Ferredoxin in den angegebenen Konzentrationen. Der apparente  $K_M$ -Wert betrug 15  $\mu\text{M}$  bei einer maximalen Rate von 70 U (mg Protein) $^{-1}$  (1 U entspricht 2  $\mu\text{mol}$  reduziertem Ferredoxin oder 1  $\mu\text{mol}$  aufgenommenen  $\text{H}_2$ ). **B:** Gemessen wurde die  $\text{H}_2$ -Bildung aus mit Natrium-Dithionit reduziertem Ferredoxin. Die 1 ml Testansätze enthielten 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid, 10 mM Natrium-Dithionit, Ferredoxin in den angegebenen Konzentrationen und 1,5 mU Ech-Hydrogenase. Die Gasphase war 100%  $\text{N}_2$ . Der apparente  $K_M$ -Wert betrug 3  $\mu\text{M}$  bei einer maximalen Rate von 200 U (mg Protein) $^{-1}$ . 1 U entspricht 1  $\mu\text{mol}$  gebildetem Wasserstoffs pro min.

## 2.5 Charakterisierung des *Ta. tengcongensis*-Ferredoxins

Das als Elektronenakzeptor oder -donor von Ech-Hydrogenase identifizierte Ferredoxin kann aus Glukose- oder Stärke-gewachsenen Zellen von *Ta. tengcongensis* in großen Mengen gereinigt werden. Der Ultrazentrifugations-Überstand wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose HiLoad, Phenyl-Sepharose HiLoad Säule und anschließender Gelfiltration an Superdex 75 gereinigt. Das auf diese Weise isolierte Ferredoxin zeigte Absorptionsmaxima im UV/Vis-Spektrum bei 280 und 390 nm (**Abb. 19**). Das  $E_{390}/E_{280}$ -Verhältnis betrug 0,75, was für eine hohe Reinheit der Präparation spricht (Terlesky & Ferry, 1988). Eine massenspektrometrische Untersuchung (MALDI-TOF) des Ferredoxins ergab eine molekulare Masse von etwa 5724 Da (**Abb. 20**). Die Massenanalyse ergab außerdem, dass die Ferredoxin-Präparation offenbar homogen war und nicht etwa eine Mischung aus verschiedenen Ferredoxinen darstellte.



**Abb. 19:** UV/Vis Absorptionsspektrum von aus *Ta. tengcongensis* gereinigtes Ferredoxin. Maxima lagen bei 280 und 390 nm. Das  $E_{390}/E_{280}$ -Verhältnis betrug 0,75, was für eine hohe Reinheit der Präparation spricht. Das Spektrum zeigt das gereinigte Ferredoxin ohne jede weitere Behandlung. Die Lösung enthielt 1 mg Ferredoxin pro 0.8 ml in 50 mM MOPS pH 7. Die Spektren wurden unter  $N_2$  als Gasphase aufgenommen.



**Abb. 20:** MALDI/TOF-Analyse des Ferredoxins von *Ta. tengcongensis*. Die bestimmte molekulare Masse war etwa 5724.

### 3. Charakterisierung einer NAD(H)-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase aus der löslichen Fraktion von *Ta. tengcongensis*

Bei der Reinigung der membrangebundenen Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis* fiel auf, dass die lösliche Fraktion ebenfalls hohe Hydrogenase-Aktivitäten, mit Methylviologen als Elektronenakzeptor, aufwies. Diese lösliche Hydrogenase(n) war jedoch nicht in der Lage, Ferredoxin zu reduzieren. Als mögliches physiologisches Substrat dieser Hydrogenase wurden daher  $\text{NAD}^+$  bzw. NADH getestet. Die lösliche Fraktion katalysierte die  $\text{H}_2$ -abhängige Reduktion von  $\text{NAD}^+$  mit einer spezifischen Aktivität von  $0,07 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ , die Rückreaktion wurde mit einer Aktivität von  $0,26 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  katalysiert.

#### 3.1 Reinigung einer NAD(H)-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis*

Diese NAD(H)-abhängige Hydrogenase wurde aus der löslichen Fraktion von *Ta. tengcongensis* gereinigt. Mehr als 90% der NAD(H)-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase-Aktivität waren in der löslichen Fraktion lokalisiert. Die Reinigung erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose, Hydrophober-Interaktions-Chromatographie an Phenyl-Sepharose und einer weiteren Anionenaustauschchromatographie an Source 30 Q. Bei einer anschließenden Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex 200 eluierte das Enzym nach 220 ml (Peakmaximum). Dieser letzte Schritt resultierte in einem symmetrischen Peak, was auf

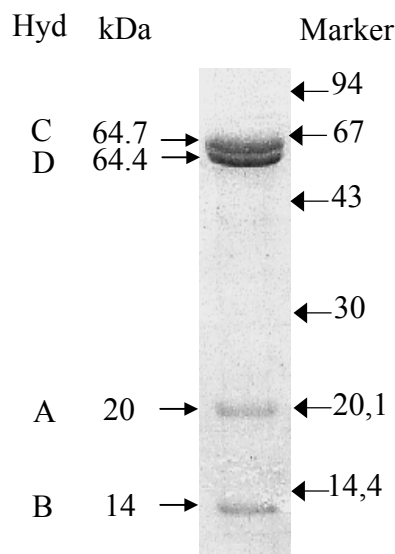
eine homogene Präparation hindeutet. Für die Enzym-Aktivitätsbestimmung wurde sowohl  $H_2$ -abhängige Reduktion von Methylviologen als auch  $H_2$ -abhängige Reduktion von  $NAD^+$  verfolgt (Tabelle 11). Die Enzym-Aktivität mit  $NAD(H)$  war wesentlich höher, wenn die Reinigung in Gegenwart von FMN erfolgte. Daher wurde routinemäßig allen für die Reinigung verwendeten Puffern 2 mM FMN zugesetzt.

**Tabelle 11: Reinigung von  $NAD(H)$ -abhängiger [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis*.** Das Enzym wurde wie unter Material und Methoden beschrieben ausgehend von 40 g Feuchtzellen (3200 mg Protein) gereinigt. Zur Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität wurde die Reduktion von Methylviologen in einem 800  $\mu$ l Testansatz (4 mM MV in 50 mM MOPS/KOH, pH 7,0 und 2 mM FMN) bei 75°C photometrisch verfolgt. 1 Unit (U) entspricht der Reduktion von 2  $\mu$ mol Methylviologen pro min. Die Reduktion von  $NAD^+$  mit  $H_2$  wurde bei 340 nm photometrisch verfolgt ( $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Der 0,8 ml Testansatz enthielt 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM FMN, und 1,2 mM  $NAD^+$ . Die Gasphase war 100%  $H_2$  bei  $1,2 \times 10^5$  Pa. 1 U Enzymaktivität entspricht der Oxidation von 1  $\mu$ mol  $H_2 \cdot \text{min}^{-1}$  (äquivalent zu der Reduktion von 1  $\mu$ mol  $NAD^+$ ).

Fraktion	Protein (mg)	Hydrogenase-Aktivität MV		Hydrogenase-Aktivität $NAD^+$	
		(U <sub>total</sub> )	(U mg <sup>-1</sup> )	(U <sub>total</sub> )	(U mg <sup>-1</sup> )
Lösliche Fraktion	2205	160 000	72,5	587	0,26
Q-Sepharose Hi Load	552	130 612	236,6	526	0,95
Phenyl-Sepharose	101	123 102	1218,8	402	4
Source 30-Q	44	71 836	1632,6	175	4
Superdex 200	31	51 795	1671	156	5

### 3.2 Molekulare Eigenschaften von $NAD(H)$ -abhängiger [FeFe]-Hydrogenase

**Abb. 21** zeigt eine SDS/PAGE-Analyse der nach der in Tabelle 11 beschriebenen Reinigungsprozedur erhaltenen Fraktion der  $NAD(H)$ -abhängigen [FeFe]-Hydrogenase. Die Präparation enthielt vier Polypeptide mit den apparenten molekularen Massen von 65, 64, 20 und 14 kDa.

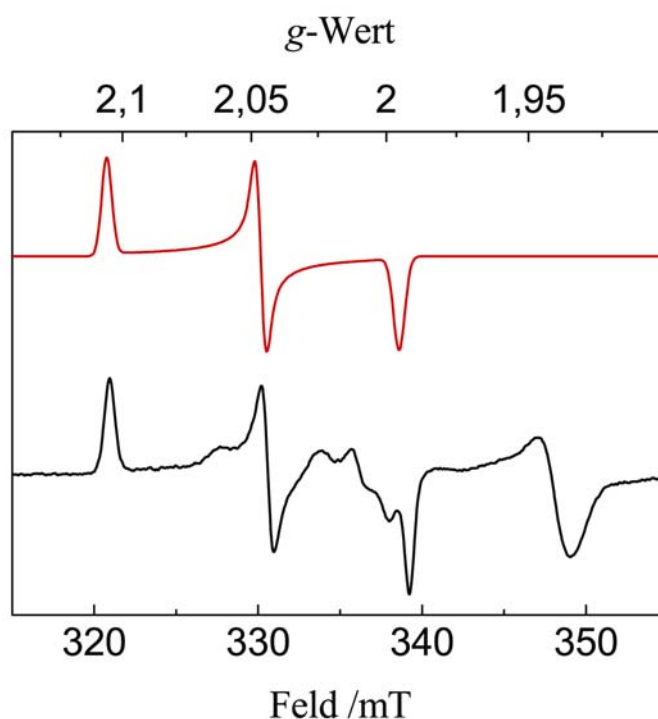


**Abb. 21: SDS/PAGE-Analyse von gereinigter NADH-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase von *Ta. tengcongensis*.** Die Proteine wurden in einem 14%igen Polyacrylamidgel (90 mm x 65 mm x 0,75 mm) aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliantblau. Die Proteinproben (10 µg) wurden durch Kochen für 5 min in SDS-Probenpuffer denaturiert. Zur Alkylierung wurde die Probe nach Denaturierung 30 min bei Raumtemperatur mit Iodacetamid inkubiert. Die Pfeile auf der rechten Seite zeigen die Migrationabstände des Molekularmassenstandards (Amersham Biosciences). Die apparenten molekularen Massen der vier Untereinheiten sind: 65 kDa (HydB), 64 kDa (HydA), 20 kDa (HydC), 14 kDa (HydD).

Die gereinigte Enzympräparation besaß eine dunkel-braune Farbe, was auf ein Eisen-Schwefel-Protein hindeutet. Die UV/Vis-spektroskopische Analyse des Enzyms zeigte Absorptionsmaxima im Bereich zwischen 350 und 500 nm, wie man es typischer Weise für Eisen-Schwefel-Proteine findet. Das Vorhandensein eines möglichen Flavincofaktors wurde aus den Absorptionsspektren nicht ohne weiteres sichtbar, da der Absorptionsbereich von proteingebundenem Flavin (Walsh et al., 1972) durch die Absorption der Eisen-Schwefel-Zentren überdeckt wird. Mit Trichloressigsäure konnte jedoch eine Verbindung mit einem typischen Flavinspektrum aus dem Enzym extrahiert werden. Durch eine HPLC-Analyse konnte dieses Flavin als FMN identifiziert werden. Eine quantitative Bestimmung ergab, dass das Enzym pro mg Protein 6,6 nmol FMN enthält. Ausgehend von einer molekularen Masse von 162,7 kDa (siehe unten) enthält das Enzym somit 1 mol FMN pro mol Enzym. Es konnten keine signifikanten Mengen an Ni im Enzym gefunden werden ( $< 0,06$  mol Ni pro mol Enzym).

### 3.3 EPR-spektroskopische Eigenschaften von NAD(H)-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis*

Die gereinigte NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase wurde mittels EPR-Spektroskopie analysiert. Hierzu wurde das Enzym zunächst durch Austausch der Gasphase gegen  $N_2$  und anschließender Inkubation bei 70°C für 20 min vorsichtig oxidiert (Autooxidation). Das so behandelte Enzym zeigt bei 30 K das in (**Abb. 22 unten**) gezeigte EPR-Spektrum. Dieses Spektrum enthält ein rhombisches Signal mit g-Werten von 2,106, 2,046 und 1,996, das simuliert werden konnte (**Abb. 22, oberes Spektrum**). Dieses Signal ist charakteristisch für den oxidierten H-Cluster von [FeFe]-Hydrogenasen (Adams, 1990). Die übrigen Signale dieses Spektrums sind wahrscheinlich auf einen [4Fe-4S]-Cluster oder auf einen [2Fe-2S] Cluster des Enzyms (siehe unten) zurückzuführen. Diese Cluster wurden wahrscheinlich unter den gewählten Bedingungen nicht vollständig oxidiert.



**Abb. 22: EPR-Spektrum von NAD(H)-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase von *Ta. tengcongensis***  
 Das EPR-Spektrum von NAD(H)-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase (4,8 mg Protein/ml) wurde nach Autooxidation (unter  $N_2$  bei 70°C für 20 min) aufgenommen (unteres Spektrum). Die Simulation des H-Cluster-Signals ist im oberen Spektrum gezeigt. Die übrigen Signale dieses Spektrums sind wahrscheinlich auf [4Fe-4S] Cluster oder auf [2Fe-2S]-Cluster des Enzyms (siehe unten) zurückzuführen. Die Cluster wurden wahrscheinlich unter diesen Bedingungen nicht vollständig oxidiert. Das Spektrum wurde unter folgenden EPR-Bedingungen aufgenommen: Temperatur, 30 K; Leistung, 3 mW; Frequenz, 9,45 GHz, Modulationsamplitude, 0,6mT; Simulationsparameter:  $g_{xyz} = 2,106, 2,046$  und  $1,996$ ;  $W_{1,2,3} = 0,53, 0,67$  und  $0,65$  mT.



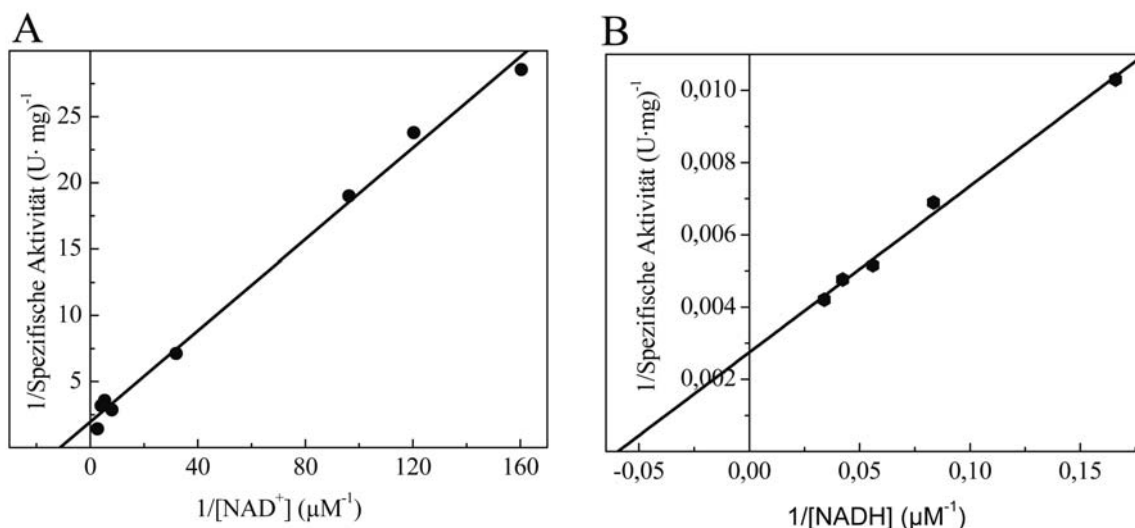
### 3.4 Katalytische Eigenschaften der NAD(H)-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase von *Ta. tengcongensis*

NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase von *Ta. tengcongensis* katalysierte die Reduktion von Methylviologen mit  $H_2$  als Elektronendonator mit einer spezifischen Aktivität von 1700 U (mg Protein) $^{-1}$  unter den Standardbedingungen (50 mM MOPS/KOH pH 7,0,  $1,2 \times 10^5$  Pa  $H_2$  in der Gasphase, 4 mM MV, 70°C). Die Rückreaktion, die Bildung von  $H_2$  aus reduziertem Methylviologen, wurde mit spezifischen Aktivitäten von durchschnittlich 1700 U (mg Protein) $^{-1}$  (pH 7,0, 70°C, 4 mM MV, davon etwa 0,4 mM reduziert) katalysiert. Unter diesen Standard-Testbedingungen waren die Aktivitäten der  $H_2$ -Bildung und der  $H_2$ -Aufnahme etwa gleich.

Das Enzym katalysierte auch die Reduktion von Benzylviologen mit NADH als Elektronendonator mit einer spezifischen Aktivität von 1300 U (mg Protein) $^{-1}$ . Mit diesem Enzymtest wurde ein  $K_M$ -Wert für NADH von 17  $\mu$ M ermittelt (**Abb 23B**).

Das Enzym katalysiert die Bildung von  $H_2$  mit NADH als Elektronendonator mit einer maximalen Umsatzrate von 10 U (mg Protein) $^{-1}$ , wobei 1 U der Bildung von 1  $\mu$ mol Wasserstoff pro Minute entspricht. Das Enzym war auch in der Lage, die durch die Spaltung von  $H_2$  frei werdenden Elektronen auf  $NAD^+$  zu übertragen. Die maximale Rate war 5 U (mg Protein) $^{-1}$ , wobei 1 U der Reduktion von 1  $\mu$ mol  $NAD^+$  pro min entspricht. Mit diesem Enzymtest wurde ein  $K_M$ -Wert für  $NAD^+$  von 90  $\mu$ M ermittelt (**Abb. 23A**).

Ausgehend von den oben ermittelten  $K_M$ -und  $V_{max}$ -Werten und unter Berücksichtigung einer molekularen Masse des Enzyms von 162,7 kDa wurde die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) des Enzyms in beide Richtungen (NADH-Oxidation und  $NAD^+$ -Reduktion) berechnet. Sie liegt bei  $1,6 \times 10^6$  M $^{-1}$  s $^{-1}$  für die NADH-Oxidation und bei  $1,5 \times 10^5$  M $^{-1}$  s $^{-1}$  für die  $NAD^+$ -Reduktion mit  $H_2$  als Elektronendonator.  $NADP^+$  wurde nicht reduziert.



**Abb. 23: Abhängigkeit der NAD(H)-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase von *Ta. tengcongensis* von der NADH- bzw. NAD<sup>+</sup>-Konzentration dargestellt in doppelt-reziproker Auftragung nach Lineweaver-Burk. A:** Gemessen wurde die NAD<sup>+</sup>-Reduktion mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator. Die 1 ml Testansätze enthielten 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM FMN, NAD<sup>+</sup> in den angegebenen Konzentrationen und 1,5 mU NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase. Die Gasphase war 100% H<sub>2</sub>. Der apparente  $K_M$ -Wert für NAD<sup>+</sup> betrug 90 μM bei einer maximalen Rate von 5 U (mg Protein)<sup>-1</sup> (1 U entspricht 1 μmol reduziertem NAD<sup>+</sup> pro min). **B** Gemessen wurde die Oxidation von NADH mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor. Die 0,8 ml Testansätze enthielten 50 mM MOPS pH 7,0, 2 mM DTT, 4 mM Benzylviologen, 2 mM FMN sowie 0,5 mU NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase und NADH in den angegebenen Konzentrationen. Die Gasphase war 100% N<sub>2</sub>. Der apparente  $K_M$ -Wert betrug 17 μM bei einer maximalen Rate von 1300 U (mg Protein)<sup>-1</sup> (1 U entspricht 2 μmol reduziertem Benzylviologen oder 1 μmol oxidiertem NADH).

### 3.5 Bestimmung der aminoterminalen Sequenzen der Untereinheiten von NAD(H)-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase von *Ta. tengcongensis* und Identifizierung der kodierenden Gene

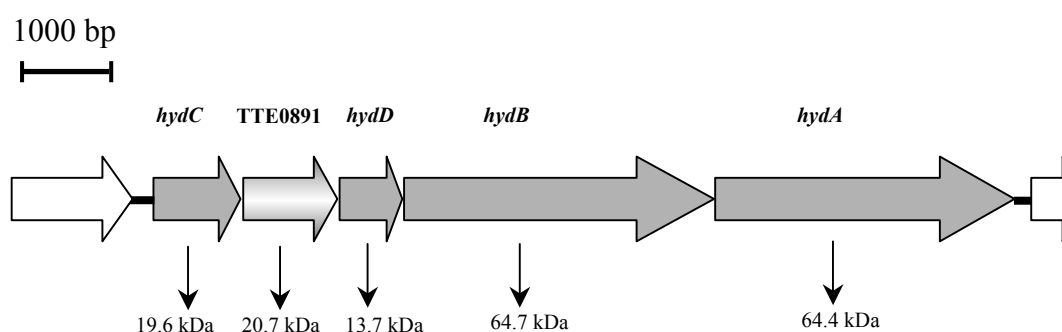
Eine SDS/PAGE-Analyse der NAD(H)-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase Präparation zeigt vier Polypeptide mit apparenten molekularen Massen von 65, 64, 20 und 14 kDa (**Abb. 21**). Die aminoterminalen Sequenzen dieser vier Polypeptide wurden bestimmt, was die Identifizierung der kodierenden Gene ermöglichte. In Tabelle 12 sind die durch Edman-Abbau bestimmten aminoterminalen Sequenzen den aus den Genen abgeleiteten Sequenzen gegenübergestellt. Somit konnte ein Gen-Cluster identifiziert werden (**Abb. 24**), das aus fünf Genen besteht. Diese kodieren für Proteine mit molekularen Massen von 64,7, 64,4, 20,1, 19,6 und 13,7 kDa. Das 20,1-kDa Protein war nicht Bestandteil des gereinigten Enzyms (s.u.). Eine Sequenzanalyse der aus den Genen abgeleiteten Proteinsequenzen zeigt, dass die einzelnen Polypeptide der Enzympräparation eine sehr hohe Sequenzverwandtschaft zu Untereinheiten der [FeFe]-Hydrogenase von *Thermotoga*

*maritima* zeigen (Verhagen et al., 1999). Daher wurde für das *Ta. Tengcongensis*-Enzym die gleiche Nomenklatur gewählt (*hydABCD*).

**Tabelle 12: Vergleich der durch Edman-Abbau bestimmten aminoterminalen Sequenzen der Untereinheiten von NADH-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase mit Proteinsequenzen, die aus der Genomsequenz von *Ta. tengcongensis* abgeleitet wurden.**

<b>65-kDa Polypeptid (HydB)</b>	MLYRSHVMVGGGTGX
Edman-Abbau	MLYRSHVMVCGGTGC
Aus dem Genom abgeleitet	
<b>64-kDa Polypeptid (HydA)</b>	MDKVRVTIDGITVEV
Edman-Abbau	MDKVRVTIDGITVEV
Aus dem Genom abgeleitet	
<b>20-kDa Polypeptid (HydC)</b>	MQGMKEASLEEKLVE
Edman-Abbau	MQGMKEASLEEKLVE
Aus dem Genom abgeleitet	
<b>14-kDa Polypeptid (HydD)</b>	MKTLEELERIRKETL
Edman-Abbau	MKTLEELERIRKETL
Aus dem Genom abgeleitet	

Die *hyd*-Gene sind alle in eine Richtung orientiert und nur durch einige Basenpaare voneinander getrennt. Ein Sequenzvergleich mit Proteinen aus den Sequenzdatenbanken und eine Sequenzanalyse der vier Untereinheiten von NADH-abhängiger Hydrogenase wurde durchgeführt.



**Abb. 24: Anordnung der Gene im Genom von *Ta. tengcongensis*, die für die NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase kodieren.** Die Gene *hydCDBA* kodieren für die Untereinheiten der Hydrogenase. Die *hyd*-Gene sind alle in eine Richtung orientiert und nur durch einige Basenpaare voneinander getrennt (max. 25 bp). Das von TT0891 abgeleitete Protein war nicht im gereinigten Enzym vorhanden.

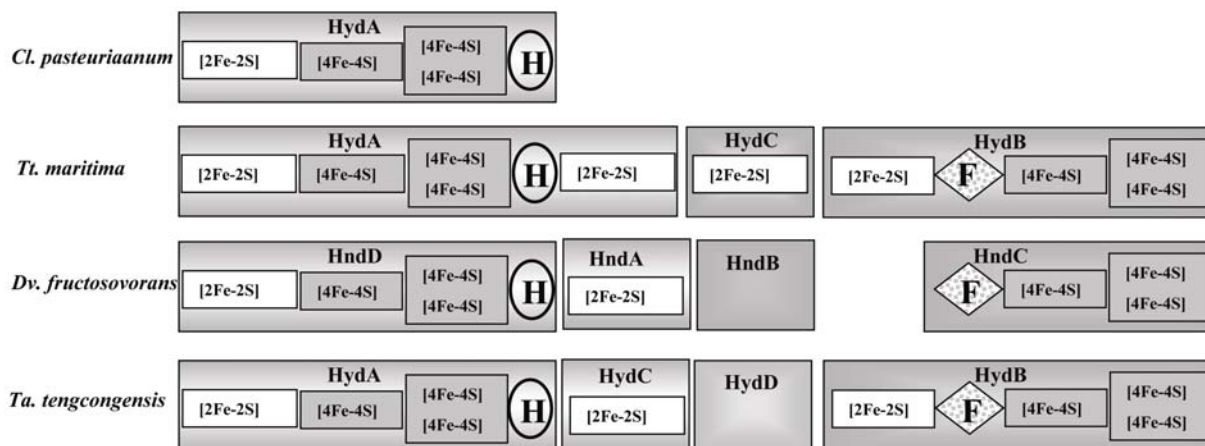
Die Proteinsequenz der 64-kDa Untereinheit (**HydA**) (581 Aminosäuren) konnte vollständig mit der Sequenz der monomeren [FeFe]-Hydrogenase von *Clostridium pasteurianum*, für die die Kristallstruktur bekannt ist, (**Abb. 25**) aligned werden (42% Sequenzidentität) (Peters et al., 1998). Zusätzlich zum H-Cluster, der im katalytischen Zentrum lokalisiert ist, enthält die *C. pasteurianum*-Hydrogenase drei [4Fe-4S]-Zentren und ein [2Fe-2S]-Zentrum. Die konservierten Cysteine, die diese Eisen-Schwefel-Zentren koordinieren, sind auch in der 64-kDa Untereinheit von *Ta. tengcongensis* vorhanden. Die 64-kDa Untereinheit konnte somit als die katalytische Untereinheit der Hydrogenase identifiziert werden.

Die 65-kDa Untereinheit (**HydB**) zeigt Sequenzähnlichkeit zu NAD(P)H-abhängigen Dehydrogenasen, z.B. die Untereinheit NuoF der NADH:Quinon-Oxidoreduktase (Weidner et al., 1993). Die Aminosäuresequenz von HydB von *Ta. tengcongensis* konnte mit der Untereinheit HydB der [FeFe]-Hydrogenase von *Thermotoga maritima* (Verhagen et al., 1999) aligned werden (65% Sequenzidentität). In HydB aus *Tt. maritima* wurde eine NAD(P)<sup>+</sup>- und eine FMN-Bindestelle, Bindemotive für drei [4Fe-4S]-Zentren und ein [2Fe-2S]-Zentrum identifiziert (**Abb 25**) (Verhagen et al., 1999). Diese Bindemotive sind auch in HydB aus *Ta. tengcongensis* konserviert.

Die 20-kDa Untereinheit (**HydC**) zeigte die höchste Sequenzidentität (47%) zu HndA-Untereinheit der NADP<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase von *Dv. fructosovorans* (Malki et al., 1995) und zur HydC-Untereinheit der [FeFe]-Hydrogenase von *Tt. maritima* (Verhagen et al., 1999; Verhagen et al., 2001). Diese Untereinheit enthält vier konservierte Cysteine. In *Dv. fructosovorans* und *Tt. maritima* wurde gezeigt, dass diese Untereinheit ein [2Fe-2S]-Zentrum enthält (De Luca et al., 1998; Verhagen et al., 2001).

Die 14-kDa Untereinheit (**HydD**) zeigt eine Sequenzverwandtschaft zur Untereinheit HndB der NADP<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase von *Dv. fructosovorans*. Beide Proteine besitzen drei konservierte Cystein-Reste.

Wie in (**Abb. 24**) gezeigt, ist ein zusätzlicher offener Leserahmen (**TT0891**) zwischen den *hydD*-und *hydC*-Genen im *Ta. Tengcongensis*-Genom lokalisiert. Das von *TT0891* abgeleitete Protein war nicht im gereinigten Enzym vorhanden. Das Protein zeigte hohe Sequenzähnlichkeit zur ATP-Bindedomäne von Histidinkinasen.



**Abb. 25: Aufbau und Domänenstruktur von [FeFe]-Hydrogenasen aus *Ta. Tengcongensis* im Vergleich zu anderen [FeFe]-Hydrogenasen.** Graue Kästen stellen Hydrogenaseuntereinheiten dar. H, H-Cluster; [2Fe-2S], [2Fe-2S]-Zentrum; [4Fe-4S], [4Fe-4S]-Zentrum; F, FMN und NAD(P)<sup>+</sup> Bindestelle.

#### 4. Die Bildung von Fermentationsprodukten durch *Ta. Tengcongensis*-Kulturen, die bei unterschiedlichem $p(\text{H}_2)$ kultiviert wurden

Es wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass in geschlossenen Flaschen gewachsene Kulturen von *Ta. tengcongensis* 1 mmol Glukose zu 1 mmol Acetat, 0,7 mmol Ethanol, 1,5 mmol CO<sub>2</sub> und 0,3 mmol H<sub>2</sub> fermentieren. In diesen Studien wurde Thiosulfat als externer Elektronenakzeptor verwendet (Xue et al., 2001). In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Fermentationsbilanz ohne externen Elektronenakzeptor durchgeführt. Da das Wachstum auf Glukose in einem geschlossenen System in Abwesenheit von Thiosulfat extrem schlecht war ( $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ ), wurde Stärke als Kohlenstoff- und Energiequelle benutzt. Dieses ergab eine Wachstumsrate ( $\mu$ ) von  $0,27 \text{ h}^{-1}$ . Acetat, Ethanol und H<sub>2</sub> wurden in Verhältnisse von  $1,4 \pm 0,2 : 0,6 \pm 0,2 : 2,8 \pm 0,2$  gebildet. Der maximale H<sub>2</sub>-Partialdruck, der in geschlossenen Flaschen erreicht wurde, war  $10^{-1} \text{ atm}$ . Wahrscheinlich wurde das Wachstum von *Ta. tengcongensis* bei höheren H<sub>2</sub>-Partialdrücken gehemmt, wie bereits für andere fermentierende Organismen beschrieben (Schröder et al., 1994; van Niel et al., 2003). Um den H<sub>2</sub>-Partialdruck niedrig zu halten, wurde *Ta. tengcongensis* in einem Fermenter unter kontinuierlicher N<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Dies ergab höhere Wachstumsraten ( $\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$  mit Glukose als Substrat). Sowohl Glukose als auch Stärke konnten als Substrate benutzt werden. Pro mmol

verbrauchter Glukose wurden 2 mmol Acetat gebildet. Hingegen wurden unter diesen Bedingungen nur Spuren von Ethanol (0,02 mmol Ethanol pro 1 mmol Glukose verbraucht) gebildet. Wegen der hohen  $N_2$ -Begasungsrate konnte  $H_2$  in diesen Experimenten nicht quantifiziert werden. Da Glukose jedoch in Abwesenheit von externen Elektronenakzeptoren quantitativ zu Acetat umgewandelt wurde, ist die Reduktion von  $H^+$  zu  $H_2$  der einzige Weg, um überschüssige Reduktionsäquivalente zu entfernen. Pro mmol verbrauchter Glukose müssen somit 4 mmol  $H_2$  gebildet werden.

### **5. Einfluss des $p(H_2)$ auf die Bildung der Hydrogenasen, Alkohol-Dehydrogenase(n) und Aldehyd-Dehydrogenase(n) in *Ta. tengcongensis***

Um den Einfluss des  $p(H_2)$  auf die Bildung der Enzyme, die an der  $H_2$ - und Ethanol-Produktion beteiligt sind, zu untersuchen, wurden verschiedene Enzymaktivitäten in Zellextrakten von Zellen, die aus in Flaschen gewachsenen Kulturen und aus den unter  $N_2$ -Begasung gewachsenen Fermenter-Kulturen stammten, bestimmt (Tabelle 13). Zellen in geschlossenen Flaschen wurden auf Stärke kultiviert, während Fermenter-Zellen auf Glukose kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen zeigten die beiden Kulturen ähnliche Wachstumsraten ( $\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,27 \text{ h}^{-1}$ ). Während die spezifische Aktivität der Ferredoxin-abhängigen [NiFe]-Hydrogenase nicht durch die Wachstumsbedingungen beeinflusst wurde, war die NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase-Aktivität etwa 4-fach höher in Zellextrakten aus Fermenter-Kulturen (niedriger  $p(H_2)$ ). Alkohol-Dehydrogenase- und Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten wurden ebenfalls gemessen. Zellextrakte aus Flaschenkulturen katalysierten die NADH-abhängige Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol mit einer spezifischen Aktivität von  $15 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ . Zellextrakte aus Fermenter-Kulturen katalysierten diese Reaktion mit einer 5-fach niedrigeren Rate  $3 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ . Wurde NADH durch NADPH als Elektronendonator ersetzt, war die Rate der Acetaldehyd-Reduktion zu Ethanol ungefähr 15-fach niedriger. Die Rückreaktion, die  $NADP^+$  oder  $NAD^+$ -abhängige Oxidation von Ethanol wurde mit einer sehr niedrigeren Rate katalysiert (Tabelle 13). Zusätzlich zu Ethanol, wurde Isopropanol als Substrat getestet. Zellextrakte von Flaschenkulturen katalysierten die  $NADP^+$ -abhängige Oxidation von Isopropanol mit einer Rate von  $11 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ , Zellextrakte der Fermenter-Kulturen mit einer Rate von  $1,5 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ . Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität wurde über die Acetaldehyd-abhängige Reduktion von  $NADP^+$  gemessen. Zellextrakte der

Flaschenkulturen katalysierten diese Reaktion mit einer spezifischen Aktivität von 1,8 U (mg Protein)<sup>-1</sup>, während Zellextrakte der Fermenter-Kulturen diese Reaktion mit 0,2 U (mg Protein)<sup>-1</sup> katalysierten. Die Reaktion war Coenzym-A-abhängig, was auf die Bildung von Acetyl-CoA hindeutet. Es konnte keine Aktivität beobachtet werden, wenn NADP<sup>+</sup> durch NAD<sup>+</sup> als Substrat ersetzt wurde.

**Tabelle 13 Spezifische Aktivitäten der Enzyme, die an der H<sub>2</sub>- und Ethanol-Bildung in *Ta. tengcongensis* beteiligt sind. Zellextrakte wurden aus in geschlossenen Flaschen oder aus mit N<sub>2</sub> begasten Fermenter-Kulturen hergestellt.**

Reaktion	Aktivität (U mg <sup>-1</sup> ) Zellaufzucht in	
	geschlossenen Flaschen	Fermenter
<b>Ferredoxin-abhängige [NiFe]-Hydrogenase</b>		
$2 \text{Fd}_{\text{red}} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{Fd}_{\text{ox}} + \text{H}_2$	1,5	1,8
$2 \text{Fd}_{\text{ox}} + \text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2 \text{Fd}_{\text{red}} \rightarrow \text{Metronidazol}$	0,16	0,19
<b>NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase</b>		
$\text{NAD}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$	0,07	0,26
$\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2$	n.b.	0,55
<b>Alkohol-Dehydrogenase</b>		
$\text{Acetaldehyd} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Ethanol} + \text{NADP}^+$	15	3
$\text{Acetaldehyd} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Ethanol} + \text{NAD}^+$	1	0,2
$\text{Ethanol} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{Acetaldehyd} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	0,05	0,006
$\text{Ethanol} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Acetaldehyd} + \text{NADH} + \text{H}^+$	0,005	0,001
$\text{Isopropanol} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{Acetone} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	11	1,5
<b>Aldehyd-Dehydrogenase</b>		
$\text{Acetaldehyd} + \text{NADP}^+ + \text{CoA} \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	1,8	0,2
$\text{Acetaldehyd} + \text{NAD}^+ + \text{CoA} \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	< 0,01	< 0,01

## 6. Protein-Kristallisationsversuche

### Kristallisationsversuche mit Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri*, CO-oxidierendem/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans* und NADH-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis*

Um detaillierte Informationen über den strukturellen Aufbau der oben genannten Enzyme zu erhalten, wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt. Zuerst wurden die in Kapitel 6 genannten „Crystal screen kits“ nach der „sitting drop“ Methode getestet. Die Proteinkonzentration betrug zwischen 10 und 20 mg/ml.

Kristallisationsexperimente wurden bislang mit Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri*, dem CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans* und der löslichen NADH-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis* durchgeführt. Hierbei wurden etwa 600 Kristallisationsbedingungen für das jeweilige Enzym bei 18°C bzw. 8 °C unter anaeroben Bedingungen getestet. Erste Kristallisationsversuche wurden auch aerob bei 4°C durchgeführt.

Da die untersuchten Membranproteine nur in Gegenwart von Detergenzien löslich sind, diese jedoch die Kristallisation sehr stark beeinflussen, wurde sowohl das Detergenz als auch dessen Konzentration variiert. Im Fall von Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* wurden bislang Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (0,2 und 1 mM) und Undecyl- $\beta$ -D-maltosid (1 mM) verwendet. Dabei wurden Konzentrationen gewählt, die leicht über der kritischen Mizellkonzentration (CMC) (0,18 mM für Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid und 0,59 mM Undecyl- $\beta$ -D-maltosid) liegen.

Unter den im folgenden angegebenen Bedingungen konnten kleine Kristalle beobachtet werden. Das Problem bei allen diesen Ansätzen war die schlechte Qualität der erhaltenen Kristalle, da sie meistens miteinander verwachsen waren bzw. abgebrochen waren, so dass sie sich für die zur Diffraktionsanalyse als ungeeignet erwiesen.

#### Ech-Hydrogenase *Ms. barkeri*

Kristallisationsansätze bei 18 °C unter anaeroben Bedingungen. Protein (6,6 mg/ml) in 10 mM MOPS/KOH (pH 7,0) plus 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid

1. 1,5 M Ammonium Sulfat, 15% Glycerol, 0,1 M TRIS HCL pH 8,5



2. 1,0 M Na Acetat, 0,1 M Imidazol HCL pH 8.0

Kristallisationsansätze bei 8 °C unter anearoben Bedingungen. Protein (17 mg/ml) in 10 mM MOPS/KOH (pH 7,0) plus 2 mM Undecyl- $\beta$ -D-maltosid

1. 30 % Iso-Propanol; 0,1 M Na-HEPES pH 7,5; 0,2 M MgCl<sub>2</sub>
2. 15% MPD; 0,1 M Na-HEPES pH 7,5; 0,2 M Natrium-Citrat

#### **CO-oxidierender/H<sub>2</sub>-bildender Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans***

Kristallisationsansätze bei 18 °C unter anearoben Bedingungen. Protein (10 mg/ml) in 10 mM MOPS/KOH (pH 7,0) plus 2 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid

1. 10% PEG 800; 0,05 M Magnesium-Acetat; 0,1 M Natrium-Acetat
2. 3.0 M Ammonium-Sulfat; 10 % MPD

#### **NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis***

Kristallisationsansätze bei 8 °C unter anearoben Bedingungen. Protein (20 mg/ml) in 10 mM MOPS/KOH (pH 7,0)

1. 1,6 M Ammonium-Sulfat; 0,1 M Na HEPES pH 7,5; 0,2 M NaCl
2. 0,2 M Ammonium-Dihydrogen-Phosphat

## V. DISKUSSION

*Carboxydotherrnus hydrogenoformans* und *Thermoanaerobacter tengcongensis* sind beides thermophile Gram-positive Bakterien, die in ihrem Energiestoffwechsel  $H_2$  bilden. In der vorliegenden Arbeit konnte aus beiden Organismen eine membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase isoliert werden. Wie eine Sequenzanalyse zeigte, gehören beide Enzyme zu einer kleinen Familie membrangebundener [NiFe]-Hydrogenasen mit Sequenzverwandtschaft zu den energiekonservierenden NADH:Chinon-Oxidoreduktasen (Komplex I). Die erhaltene Hydrogenase-Präparation aus *Ca. hydrogenoformans* besaß ebenfalls eine sehr hohe CO-Dehydrogenase-Aktivität und CO-Dehydrogenase konnte als Bestandteil der Enzympräparation identifiziert werden. Es wurden Hinweise erhalten, dass beide Enzyme einen festen, katalytisch aktiven Komplex bilden. Der Aufbau dieses Enzymkomplexes und die physiologische Funktion im Stoffwechsel von *Ca. hydrogenoformans* sollen in den beiden folgenden Abschnitten ausführlich behandelt werden. Aus *Ta. tengcongensis* konnte neben der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase noch eine lösliche NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase isoliert werden. Die Eigenschaften beider Enzyme und ihre Rolle im Stoffwechsel von *Ta. tengcongensis* werden in einem späteren Abschnitt diskutiert.

### 1. Nachweis der Bildung eines Enzymkomplexes zwischen Hydrogenase und CO-Dehydrogenase aus *Ca. hydrogenoformans*

Die Bestimmung der  $H_2$ -Bildungsraten aus CO, die mit der gereinigten Enzympräparation durchgeführt wurde, ergab einen linearen Anstieg der  $H_2$ -Bildungsraten mit steigender Proteinkonzentration. Diese Daten sprechen gegen ein Mehrkomponentensystem und unterstützen die Vorstellung, dass CO-Dehydrogenase und Hydrogenase einen festen Komplex bilden in dem der Elektronentransfer vom katalytischen Zentrum der CO-Dehydrogenase zum katalytischen Zentrum der Hydrogenase erfolgt. Auch konnten beide Enzyme mit den verwendeten chromatographischen Verfahren nicht voneinander getrennt werden.

Um weitere Hinweise zu erhalten, dass Hydrogenase und CO-Dehydrogenase einen festen Komplex bilden und unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen nicht zufällig coeluierten, wurden weitere Experimente durchgeführt. Die chromatographischen Eigenschaften von gereinigter CO-Dehydrogenase (siehe Material und Methoden) wurden

mit den Eigenschaften der CO-Dehydrogenase und der Hydrogenase im möglichen Enzymkomplex verglichen. Während CO-Dehydrogenase von der Hydroxyapatit-Säule mit 0,03 M Kaliumphosphat eluierte, eluierten CO-Dehydrogenase und Hydrogenase (im Enzymkomplex) mit 1 M Kaliumphosphat. CO-Dehydrogenase eluierte nach Gelfiltration an Superdex 200 nach 220 ml, was einer molekularen Masse von 120 kDa entspricht. Der Enzym-Komplex eluierte nach 187 ml, was einer molekularen Masse von 450 kDa entspricht. Das Vorhandensein von zwei aktiven Zentren wurde auch durch Hemmversuche getestet; CO-Dehydrogenase-Aktivität wurde spezifisch durch Cyanid blockiert und Hydrogenase-Aktivität wurde durch CO oder Acetylen blockiert. Diese Daten zusammen mit den oben beschriebene kinetischen Daten zeigen, dass Hydrogenase und CO-Dehydrogenase einen funktionellen Enzymkomplex bilden.

*In vivo* liegen vermutlich auch die CO-Dehydrogenase und die Hydrogenase aus *R. rubrum* als Komplex vor, der jedoch bei der Reinigung sehr leicht in die Einzelkomponenten dissoziiert. Ähnliches gilt möglicherweise auch für den sogenannten Formiat-Hydrogenlyasekomplex aus *E. coli*. Etwas anders stellt sich die Situation für Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* dar. Im Falle dieses Enzyms gibt es Hinweise, dass die Reduktionsäquivalente für die H<sub>2</sub>-Bildung aus der Oxidation der Carbonylgruppe des Acetats zu CO<sub>2</sub> stammen. Der diese Reaktion katalysierende CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase-Komplex ist nicht mit Ech-Hydrogenase assoziiert. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass ein kleines Ferredoxin als Substrat beider Enzym fungiert und somit den Elektronentransfer zwischen beiden Enzymen übernimmt (Meuer et al., 1999).

## 2. Molekularer Aufbau und Funktion des Enzymkomplexes aus

### *Ca. hydrogenoformans*

Der gereinigte Enzymkomplex besteht aus acht Untereinheiten, sechs hydrophilen und zwei hydrophoben Polypeptiden. Nach Bestimmung der aminoterminalen Sequenzen konnten die kodierenden Gene, die in zwei direkt aufeinander folgenden Genclustern lokalisiert sind, im Genom von *Ca. hydrogenoformans* identifiziert werden. Die biochemische Charakterisierung des Enzymkomplexes und eine Sequenzanalyse der Untereinheiten zeigten, dass der Enzymkomplex aus einer Ni-haltigen Kohlenmonoxid-

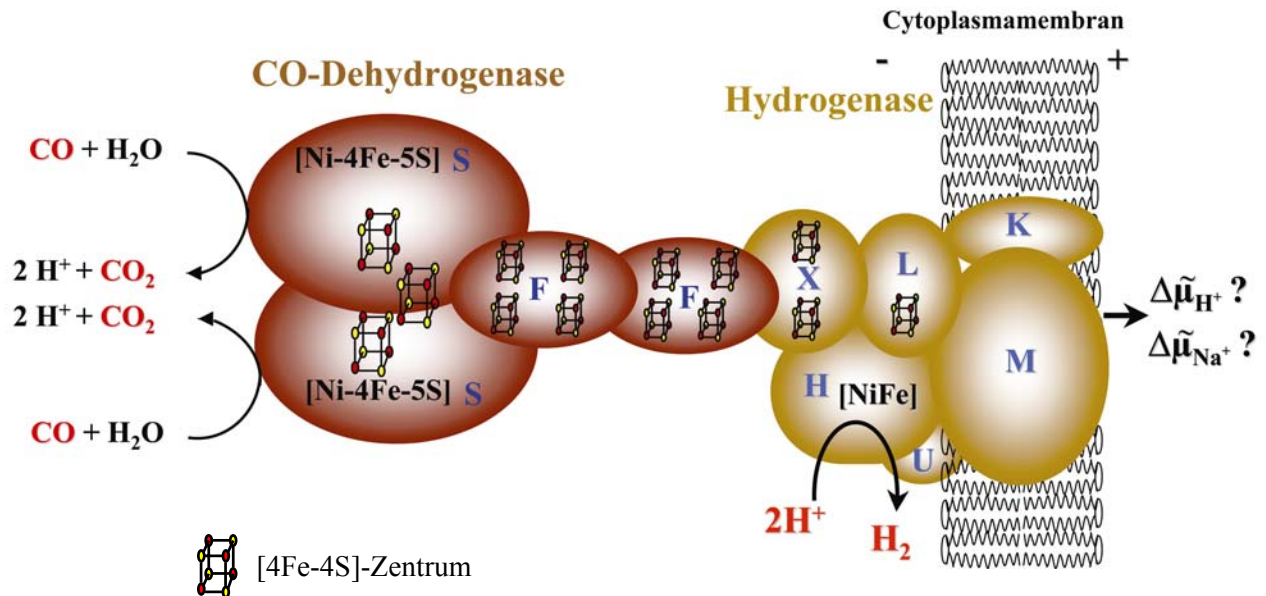
Dehydrogenase, einem Polyferredoxin und einer membranständigen [NiFe]-Hydrogenase aufgebaut ist. Die in dieser Arbeit erzielten Daten zeigen, dass CO-Dehydrogenase und Hydrogenase aus *Ca. hydrogenoformans* fest miteinander assoziiert vorliegen und wie oben diskutiert einen funktionellen Komplex bilden. Aufgrund der vorliegenden Daten wird das in **Abb. 26** dargestellte Modell zum Aufbau dieses Enzymkomplexes vorgeschlagen. Der Aufbau des Hydrogenase-Subkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans* deckt sich im wesentlichen mit dem Aufbau von Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri*, dem einzigen Vertreter dieser Hydrogenase-Familie, der in der Vergangenheit gereinigt werden konnte (Meuer et al., 1999). Während gereinigte Ech-Hydrogenase jedoch aus sechs Untereinheiten, vier hydrophilen und zwei hydrophoben Proteinen, zusammengesetzt ist, bildet im Fall des *Ca. hydrogenoformans*-Enzyms einen Komplex mit der CO-Dehydrogenase. Die aus den für die Hydrogenase kodierenden Genen abgeleiteten Proteinsequenzen zeigen die höchste Sequenzverwandtschaft zu der CO-induzierten Hydrogenase aus *R. rubrum*. Da dieses Enzym jedoch nicht gereinigt werden konnte, ist ein direkter biochemischer Vergleich zwischen beiden Enzymen nicht möglich.

Bei dem **CooS-Protein** des Enzymkomplexes handelt es sich um die CO-Dehydrogenase. Aus der Kristallstruktur eng verwandter Proteine, beispielsweise einer zweiten CO-Dehydrogenase aus *Ca. hydrogenoformans*, ist bekannt, dass diese Protein als Homodimer vorliegt. Beide Untereinheiten sind über ein gemeinsames [4Fe-4S]-Zentrum kovalent miteinander verknüpft. Das Homodimer koordiniert zwei weitere [4Fe-4S]-Zentren sowie zwei neuartige [Ni-4Fe-5S]-Zentren, die im katalytischen Zentrum des Enzyms liegen (Dobbek et al., 2001; Svetlichnyi et al., 2001). Die aus *R. rubrum* gereinigte CO-Dehydrogenase besteht ebenfalls nur aus dem CooS-Dimer (Bonam & Ludden 1987; Kerby et al., 1992). Dies wurde durch Röntgenstruktur bestätigt (Drennan et al., 2001). In *R. rubrum* bleibt das CooF-Protein, dessen Gen mit dem *cooS*-Gen eine Transkriptionseinheit bildet, nur unter bestimmten Reinigungsbedingungen mit dem CooS-Protein assoziiert (Ensign & Ludden, 1991). CooF ist für die CO-Dehydrogenase-Aktivität, getestet mit Methylviologen als Elektronenakzeptor, nicht essentiell. Jedoch ist dieses Protein essentiell für die Rekonstitution eines CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Systems bestehend aus CooS, CooF und der Hydrogenase-haltigen Membranfraktion (Ensign & Ludden, 1991). Ein zu CooF verwandtes Protein wird auch durch das *E. coli-hyc*-Operon kodiert (HycB) (Böhm et al., 1990). Das *hyc* Operon kodiert für die Hydrogenase-3 aus *E. coli*. HycB, das wie CooF vier Bindemotive für [4Fe-4S] Zentren besitzt, spielt vermutlich

eine Rolle beim Elektronentransfer zwischen Formiat-Dehydrogenase und der Hydrogenase.

Die in dieser Arbeit erzielten Daten zeigen, dass die Untereinheit CooF der CO-Dehydrogenase vermutlich als Elektronenüberträger zwischen der katalytischen Untereinheit CooS und einer der Untereinheiten der Hydrogenase fungiert. Hierbei könnte es sich um die Untereinheit CooX handeln, einem kleinen Fe/S-Protein mit zwei Bindemotiven für [4Fe-4S]-Zentren. Die weitere Elektronenübertragung erfolgt dann vermutlich über die „Hydrogenase kleine Untereinheit“ (CooL) auf die „Hydrogenase große Untereinheit“ (CooH), die das katalytische Zentrum trägt.

Die Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses von CO-Dehydrogenase zu Hydrogenase im Komplex durch die Quantifizierung der verschiedenen Proteinbanden ergab, dass die beiden CO-Dehydrogenase-Untereinheiten (CooS und CooF) in einer 2:1-Stöchiometrie zu den Hydrogenase-Untereinheiten vorliegen. Bezogen auf eine molekulare Masse von 441 kDa, die sich aus der Addition der sechs Untereinheiten der Hydrogenase und jeweils zwei CooS- und CooF-Massen ergibt, konnten 3 mol Nickel, 59 mol säurelabiler Schwefel und 61,5 mol Nicht-Häm-Eisen pro mol Enzym bestimmt werden. Aus der Primärstruktur kann vorhergesagt werden, dass 1 mol des Enzymkomplexes 3 mol Nickel, 66 mol säurelabiler Schwefel und 65 mol Nicht-Häm-Eisen enthält. Anhand diesen Daten, wurde vorgeschlagen, dass ein CO-Dehydrogenase-Dimer mit einem Hydrogenase-Monomer wechselwirkt (**Abb. 26**).



**Abb. 26: Modell zum Aufbau des energiekonservierenden CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus *Ca. hydrogenoformans*.** Gezeigt ist der postulierte Aufbau des Enzymkomplexes aus dem Hydrogenase-Subkomplex und dem CO-Dehydrogenase-Subkomplex; [NiFe] = aktives Zentrum der Hydrogenase; [Ni-4Fe-5S] aktives Zentrum der CO-Dehydrogenase.

Wie bereits oben beschrieben, liegt in *Ca. hydrogenoformans* die CO-Dehydrogenase nicht ausschließlich im Komplex mit der Hydrogenase vor. Die CooS-Untereinheit der CO-Dehydrogenase konnte auch in freier Form aus der löslichen Fraktion isoliert werden. Umgekehrt wurde jedoch die Hydrogenase immer nur im Komplex mit der CO-Dehydrogenase gefunden. Möglicherweise ist die Expression der beiden Gencluster nicht exakt koordiniert, was zu einem Überschuss an CO-Dehydrogenase führen könnte. Die Gruppe von Meyer konnte darüber hinaus eine zweite CO-Dehydrogenase, als CO-DH II bezeichnet, aus *Ca. hydrogenoformans* reinigen (Svetlichnyi et al., 2001). Das gereinigte Protein bestand nur aus dem CooS II-Dimer. Das kodierende Gen bildet jedoch eine Transkriptionseinheit mit einem *cooF*-Gen (*cooFII*). Von dem CooS II-Homodimer konnte, wie oben beschrieben, die Kristallstruktur bestimmt werden. Die Funktion dieser zweiten CO-Dehydrogenase, die etwa 48% Sequenzidentität zur CO-Dehydrogenase I zeigt, ist bislang unbekannt.

### 3. Zwei unterschiedliche Hydrogenasen katalysieren die H<sub>2</sub>-Bildung in

#### *Ta. tengcongensis*

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass das thermophile Gram-positive Bakterium *Ta. tengcongensis* zwei verschiedene Hydrogenasen besitzt, eine NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase und eine Ferredoxin-abhängige [NiFe]-Hydrogenase, die während der Fermentation anfallenden Reduktionsäquivalente auf Protonen übertragen und dabei H<sub>2</sub> erzeugen. Der H<sub>2</sub>-Metabolismus in *Ta. tengcongensis* unterscheidet sich von dem anderer fermentierender Mikroorganismen, die entweder eine Ferredoxin-abhängige oder eine NADH-abhängige Hydrogenase besitzen. So wurde gezeigt, dass saccharolytische Clostridien Glucose über den Emden-Meyerhof Stoffwechselweg fermentieren. Pyruvat wird von Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> oxidiert, reduziertes Ferredoxin fungiert als Elektrondonor für zwei lösliche monomere [FeFe]-Hydrogenasen (Adams, 1990). Ein Teil des NADH, das im Zuge der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion gebildet wird, wird durch Reduktion von Ferredoxin reoxidiert. Reduziertes Ferredoxin fungiert dann, wie oben beschrieben, als Substrat der [FeFe]-Hydrogenasen. Die Oxidation von NADH ( $E^{\circ'} = -320$  mV) durch Ferredoxin ( $E^{\circ'} = -420$  mV) wird von NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase katalysiert (Jungermann et al., 1973). Diese endergone Reaktion wird durch revertierten Elektronentransport getrieben. Eine membrangebundene NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde kürzlich aus *Clostridium tetanomorphum* isoliert (Boiangiu et al., 2004). Dieses Enzym zeigt Sequenzverwandtschaft zu einer Gruppe von Na<sup>+</sup>-pumpenden NADH:Ubiquinon Oxidoreduktasen, die bislang nur in einigen Gram-negativen Bakterien identifiziert wurden (Steuber, 2001). Diese letzteren Enzyme zeigen keine Sequenzverwandtschaft zu NADH:Ubiquinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus Mitochondrien und den meisten anderen Bakterien (siehe unten).

Ein anderes Beispiel für einen Organismus, der H<sub>2</sub> fermentativ produziert ist *Thermotoga maritima*, ein thermophiles, anaerobes Eubakterium (Schröder et al., 1994). H<sub>2</sub>-Bildung durch *Tt. maritima* wird durch eine heterotrimere cytoplasmatische [FeFe]-Hydrogenase katalysiert (Verhagen et al., 1999). Das gereinigte Enzym zeigt weder Aktivität mit reduziertem Ferredoxin noch mit NAD(P)H als Elektrondonor. Durch Sequenzanalysen konnte vorausgesagt werden, dass das Enzym ein Eisen-Schwefel-Cluster enthaltendes Flavoprotein ist, welches NAD(P)H als Elektrondonor nutzt.

Eine andere Art von Hydrogenasen ist für die fermentative H<sub>2</sub>-Produktion im hyperthermophilen anaeroben Archaeon *Pyrococcus furiosus* verantwortlich. Das Genom von *P. furiosus* enthält ein putatives *mbhA-N*-Operon, welches für einen aus 14 Untereinheiten bestehenden, membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase-Komplex kodiert (Sapra et al., 2000; Silva et al., 2000). Es wird angenommen, dass dieser Enzymkomplex für die fermentative H<sub>2</sub>-Produktion in *P. furiosus* verantwortlich ist. Der intakte Mbh-Komplex konnte bisher nicht gereinigt werden, jedoch katalysiert die gewaschene Membranfraktion von *P. furiosus* H<sub>2</sub>-Bildung mit reduziertem Ferredoxin, das aus *P. furiosus* gereinigt wurde. Mit invertierten Membranvesikel von *P. furiosus* wurde gezeigt, dass H<sub>2</sub>-Bildung mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator mit dem Aufbau eines elektrochemischen Protonenpotentials gekoppelt ist, das zur ATP-Synthase genutzt wird (Sapra et al., 2003). Somit gewinnt der Organismus zusätzlich zur Substrat-Stufen-Phosphorylierung Energie durch Respiration. Das erklärt auch, warum *P. furiosus* eine ungewöhnliche Glykolyse hat, bei der Ferredoxin anstelle des normalerweise erwarteten NAD<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor bei der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Oxidation dient.

Die hier beschriebene [NiFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis* gehört zu einer kleinen Gruppe membrangebundener [NiFe]-Hydrogenasen, zu der auch die oben beschriebene Hydrogenase aus *Ca. hydrogenoformans* und Ech Hydrogenase aus *Ms. barkeri* gehören. Diese Enzyme sind durch sechs konservierte Untereinheiten gekennzeichnet. Auch die oben beschriebene membrangebundene Hydrogenase aus *P. furiosus* gehört zu dieser Gruppe von Enzymen. Das *P. furiosus* Enzym bildet jedoch zusammen mit den in *Methanothermobacter marburgensis* identifizierten Hydrogenasen Eha und Ehb eine Untergruppe von Enzymen, die sich durch einen deutlich komplexeren Aufbau mit bis zu 20 Untereinheiten auszeichnen. Diese Daten sind jedoch aus der Analyse der kodierenden Gencluster abgeleitet. Es konnte bislang kein Mitglied dieser Gruppe von Enzymen gereinigt werden.

Die hier beschriebene Ech-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis* ist das erste Enzym dieser [NiFe]-Hydrogenase-Familie, das aus einem fermentierenden Organismus gereinigt wurde. Die kinetischen Daten deuten stark darauf hin, dass in *Ta. tengcongensis* Ferredoxin als physiologisches Substrat des Enzyms fungiert. Das Enzym katalysiert *in vitro* die Wasserstoff-Bildung mit einer etwa 13-fach höheren katalytischen Effizienz ( $k_{\text{cat}}/k_{\text{M}}$ ) im Vergleich zur H<sub>2</sub>-Aufnahme, was mit seiner physiologischen Rolle in der H<sub>2</sub>-Bildung im



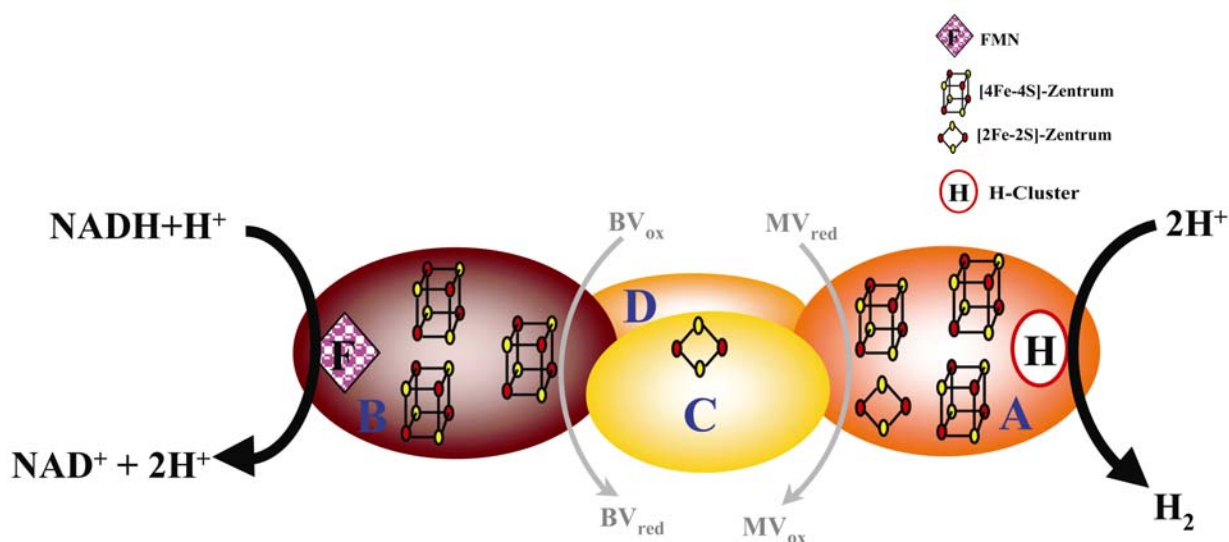
fermentativen Stoffwechsel übereinstimmt. Eine mögliche Funktion des Enzyms als Protonenpumpe soll im Abschnitt 5 ausführlicher diskutiert werden.

Die NADH-abhängige Hydrogenase von *Ta. tengcongensis* zeigt die höchste Sequenzähnlichkeit zu der HndABCD-Hydrogenase aus *Dv. fructosovorans* und zu der HydABC-Hydrogenase aus *Tt. maritima* (Malki et al., 1995; Verhagen et al., 1999). Die Untereinheiten-Architektur ist in den drei Enzymen mit nur wenigen Unterschieden konserviert (**Abb. 25**). Das *Ta. tengcongensis*-Enzym und das *Dv. Fructosovorans*-Enzym enthalten je eine vierte Untereinheit (HydD und HndB), die nicht in der *Tt. Maritim*-Hydrogenase vorhanden ist. Die Funktion dieser Untereinheit, die drei konservierte Cystein-Reste trägt, ist unbekannt. Untereinheit HydB des *Tt. Maritima*- und des *Ta. tengcongensis*-Enzyms enthalten eine aminoterminaler Verlängerung von 106 Aminosäuren, die in der entsprechenden Untereinheit (HndC) des *Dv. Fructosovorans*-Enzyms fehlt. Diese Verlängerung von HydB trägt ein Bindemotiv für ein [2Fe-2S]-Zentrum. Die Untereinheit HydA des *Tt. maritima* Enzyms enthält eine carboxyterminale Verlängerung von 65 Aminosäuren mit einem Bindemotiv für ein [2Fe-2S]-Zentrum. Diese carboxyterminale Verlängerung fehlt der Untereinheit HydA des *Ta. tengcongensis* Enzyms und der Untereinheit HndA des *Dv. Fructosovorans*-Enzyms.

Die geringe Konzentration des Enzyms aus *Dv. fructosovorans* in der Zelle hat seine Reinigung bislang verhindert. Jedoch hat die Charakterisierung einer HndC-Deletionsmutante gezeigt, dass das Enzym für die  $\text{NADP}^+$ -Reduktion durch  $\text{H}_2$  verantwortlich ist (Malki et al., 1995).  $\text{H}_2$ -abhängige  $\text{NADP}^+$ -Reduktase-Aktivität war darüber hinaus in Zellen, die mit  $\text{H}_2$  gewachsen waren, 10-fach höher.  $\text{NAD}^+$  wurde nicht durch Zellextrakte von *Dv. fructosovorans* reduziert. Aus diesen Daten wurde gefolgert, dass das *Dv. fructosovorans* Enzym *in vivo* die  $\text{H}_2$ -abhängige  $\text{NADP}^+$ -Reduktion übernimmt (Malki et al., 1995).

Die HydABC-Hydrogenase vom *Tt. maritima* ist als heterotrimeres Enzym gereinigt worden. Aus der Sequenzanalyse wurde gefolgert, dass es sich bei diesem Enzym um ein Eisen-Schwefel Flavoprotein handeln muss, das NAD(P)H als Elektronendonator verwendet. Jedoch enthält das gereinigte Enzym weder Flavin noch katalysiert es die NAD(P)H-abhängige  $\text{H}_2$ -Bildung oder  $\text{NAD(P)}^+$ -Reduktion durch  $\text{H}_2$  (Verhagen et al., 1999). Im Gegensatz hierzu enthält die NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase von *Ta.*

*tengcongensis* equimolare Mengen FMN und kann NAD(H) als Substrat verwenden. Eine Analyse der abgeleiteten Proteinsequenzen des Enzyms zeigt, dass das Enzym zwei katalytische-Zentren enthält: das katalytische Zentrum der Hydrogenase mit dem H-Cluster und das katalytische Zentrum für die NAD(H) Oxidation/Reduktion mit dem Flavinkofaktor. Die beiden katalytischen Zentren sind über mehrere [FeS]-Zentren miteinander verbunden (Abb. 27).



**Abb. 27: Modell zum Aufbau der NADH-abhängigen [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis*.** Das Enzym enthält zwei katalytische Zentren: das katalytische Zentrum der Hydrogenase mit dem H-Cluster und das katalytische Zentrum für die NAD(H) Oxidation/Reduktion mit dem Flavinkofaktor. Die beiden katalytischen Zentren sind über mehrere [FeS]-Zentren miteinander verbunden. Die hellgrauen Pfeile symbolisieren den möglichen Angriffsort von Viologenfarbstoffen mit Hilfe derer die spezifischen Aktivitäten der beiden katalytischen Zentren bestimmt wurde.

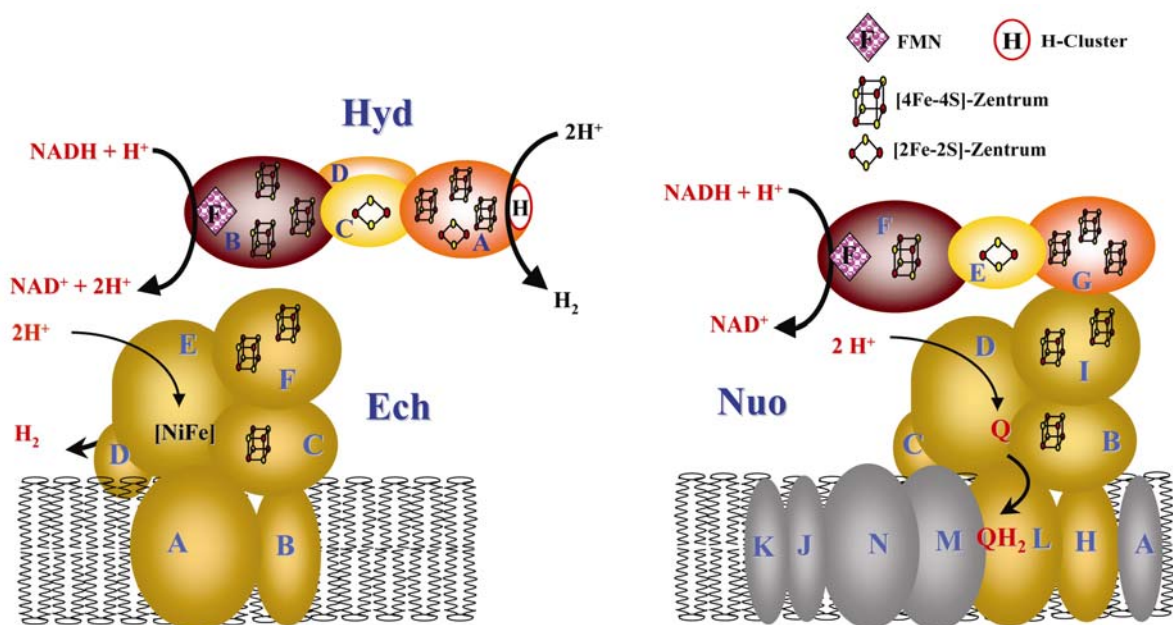
Die Aktivität an beiden katalytischen Zentren kann mit Viologenfarbstoffen als einem Redox-Partner auch individuell bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass das Enzym sowohl die NADH-abhängige Reduktion von Benzylviologen als auch die H<sub>2</sub>-Bildung mit reduziertem Methylviologen mit sehr hohen Raten katalysiert. Im Vergleich hierzu waren die Gesamtaktivitäten, die NADH-abhängige H<sub>2</sub>-Bildung und die Reduktion von NAD<sup>+</sup> durch H<sub>2</sub>, etwa 130 bzw. 170-fach niedriger. Dies deutet darauf hin, dass die Rate der Elektronenübertragung zwischen beiden katalytischen Zentren der limitierende Schritt ist. Ein möglicher Grund für die niedrige Elektronenübertragungsrate könnte in der Schädigung eines der Metall-Zentren während der Enzymreinigung liegen. Jedoch war die Rate der NADH-abhängigen H<sub>2</sub>-Bildung im Zellextrakt bereits etwa 140-fach niedriger als

die Aktivitäten der beiden katalytischen Zentren, die mit Viologen-Farbstoffen gemessen wurden. Somit könnte die niedrige Elektronenübertragungsrate auch eine intrinsische Eigenschaft des Enzyms sein. Zumindest ist die Rate der NADH-abhängigen H<sub>2</sub>-Bildung in Zellextrakten (0.5 U (mg Protein)<sup>-1</sup>) in der gleichen Größenordnung wie die Rate des Glukoseverbrauch in wachsenden Kulturen (etwa 0.3 µmol (mg Protein)<sup>-1</sup>) (Daten nicht gezeigt). Somit sind die erhaltenen *in vitro*-Aktivitäten für die NADH-abhängige H<sub>2</sub>-Bildung zumindest nicht unrealistisch niedrig.

Das Gen-Cluster, das für die NADH-abhängige-Hydrogenase in *Ta. tengcongensis* kodiert, enthält einen zusätzlichen offenen Leserahmen (TTE0891), der nicht für eine Hydrogenase Untereinheiten kodiert (**Abb. 24**). Das TTE089-Gen kodiert für ein 21-kDa Protein. Verwandte Proteine (etwa 40% Sequenzidentität) mit einer vergleichbaren molekularen Masse werden nur durch das Genom von *Tt. maritima* (TM1665) und das Genom von *Clostridium thermocellum* kodiert. Während in *Tt. maritima* dieses Gen nicht mit einem Hydrogenase Gen-Cluster assoziiert ist, ist dieses Gen in *Clostridium thermocellum* Teil eines Gen-Clusters, das für eine NAD(H)-abhängige [FeFe]-Hydrogenase kodiert. Diese Daten wurden aus der vorläufigen Genomsequenz von *Clostridium thermocellum* abgeleitet ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/cloth/cloth.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/cloth/cloth.home.html)). Eine Sequenzanalyse des Proteins aus diesen drei Organismen zeigt eine sehr hohe Sequenzidentität der aminoterminalen Domäne (erste 90 Aminosäuren) zur ATP-bindenden Kinase-Domäne von Histidinkinasen (West & Stock, 2001). Jedoch fehlt diesen Proteinen die Dimerisierungs-Domäne der Histidinkinasen mit dem konservierten Histidin-Rest. Die carboxyterminale Sequenz des Proteins (90 Aminosäuren) zeigt keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Da die ATP-bindende Domäne der Histidinkinasen auch in der ATPase Domäne der Gyrase B und des Chaperons Hsp90 konserviert sind (West & Stock, 2001), bleibt die Funktion des durch das TTE089-Gen kodierten Proteins unbekannt. Bislang wurden keine Proteine identifiziert, die an der Maturation von [FeFe]-Hydrogenasen, insbesondere der Synthese des H-Clusters, beteiligt sein könnten. Der hier untersuchte Hydrogenase Gen-Cluster aus *Ta. tengcongensis* ist eines der wenigen Beispiele, wo in einem Hydrogenase-Operon ein nicht-Strukturgen lokalisiert ist. Diese stellen somit auch potentielle Biosynthese-Gene dar. Bislang wurden lediglich in dem Operon, dass für die Hydrogenase aus *Tt. maritima* kodiert, insgesamt fünf weitere offene Leserahmen identifiziert (TM1420, TM1421, TM1422, TM1423 and TM1427). Von diesen kodieren drei für Eisen-Schwefel Proteine. Ihre Funktion ist jedoch

unbekannt (Pan et al., 2003). Homologe zu TM1420, TM1421, TM1422, TM1423 und TM1427 finden sich auch in dem Genom *Ta. tengcongensis*. Diese Gene sind hier jedoch nicht Teil des Hydrogenase-Operons.

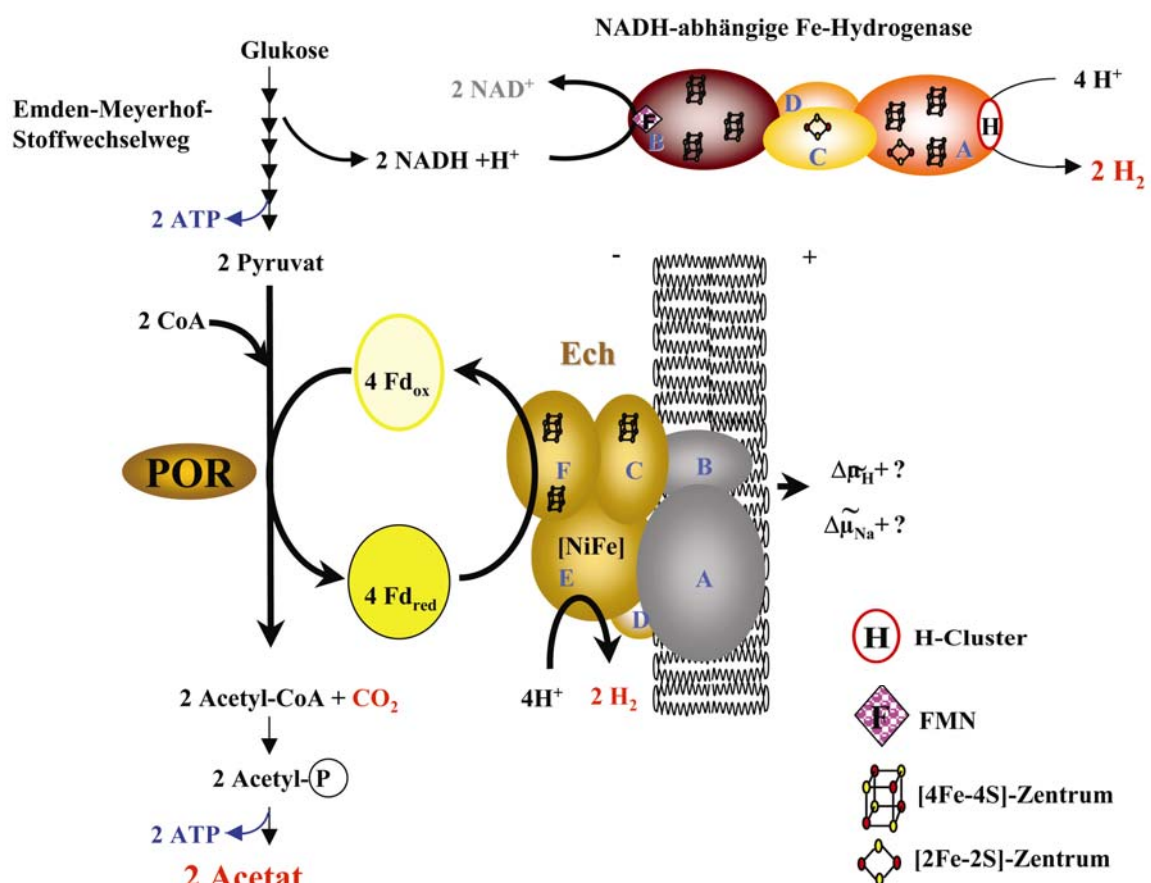
Interessanterweise zeigen beide Hydrogenasen aus *Ta. tengcongensis* Sequenzähnlichkeit zu Komplex I. Die NADH-abhängige-Hydrogenase ist dem NADH-Dehydrogenase-Fragment von Komplex I sehr ähnlich. Die Untereinheiten der NADH-abhängigen-Hydrogenase wurden durch die Genomannotierung als Komplex I Untereinheiten NuoG (75-kDa Untereinheit), NuoE (24-kDa Untereinheit) und NuoF (51-kDa Untereinheit) bezeichnet (Bao et al., 2002). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen klar, dass diese Untereinheiten eine NADH-abhängige [FeFe]-Hydrogenase bilden und nicht Teil von Komplex I sind. Die membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase ist dem zentralen Energie-konservierenden Modul von Komplex I sequenzverwandt und zeigt einen ähnlichen molekularen Aufbau (Abb. 28).



**Abb. 28:** Modell zum Aufbau von Ech-Hydrogenase und NADH-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase aus *Ta. tengcongensis* im Vergleich zu NADH:Quinon-Oxidoreduktasen (Komplex I). Als Bsp. ist Komplex I aus *Escherichia coli* gezeigt. Homologe Untereinheiten sind in gleichen Farben dargestellt. [NiFe]: Nickel-Eisen-Zentrum, 4Fe: [4Fe-4S]-Zentrum, 2Fe: [2Fe-2S]-Zentrum, Q: Ubichinon oder Menachinon, Fd: Ferredoxin.

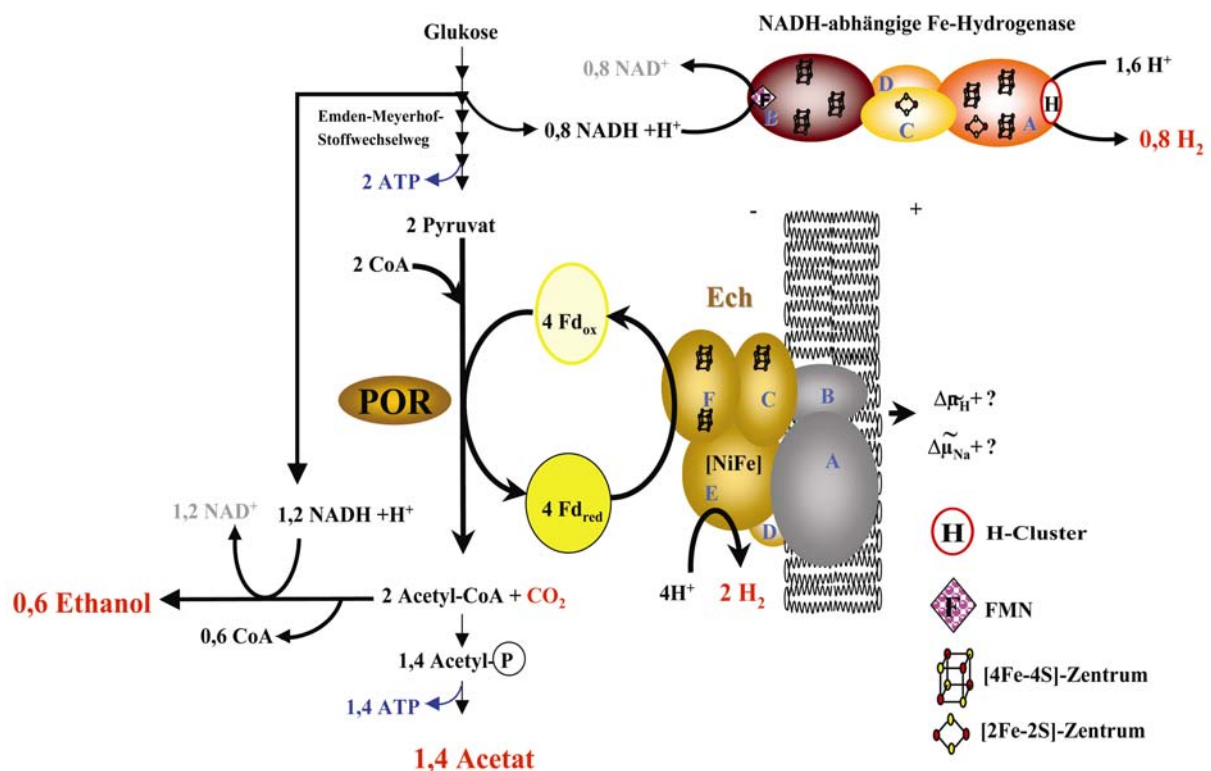
#### 4. Fermentationswege in *Ta. tengcongensis* in Abhängigkeit vom $p(\text{H}_2)$

*Ta. tengcongensis* benutzt die Enzyme des Emden-Meyerhof-Stoffwechselwegs, um Glukose zu Pyruvat umzusetzen. Der Stoffwechselweg erzeugt 2 ATP und 2 NADH. Pyruvat wird zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> durch Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) oxidiert und die Elektronen auf Ferredoxin übertragen. Acetyl-CoA wird anschließend zu Acetat mittels Phosphotransacetylase und Acetatkinase umgesetzt. Diese Reaktion führt zur Bildung von 1 ATP pro Acetat. Die Bildung der Enzyme, die die unterschiedlichen Schritte katalysieren, ist vor kurzem in einer Proteom-Studie von *Ta. tengcongensis* gezeigt worden (Wang et al., 2004). Die Bildung von POR wurde auch in dieser Arbeit durch Enzymaktivitätsmessung nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Bei niedrigem p(H<sub>2</sub>) (ungefähr 10<sup>-4</sup> atm.), wurde Glukose in *Ta. tengcongensis* Kulturen vollständig zu Acetat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> umgesetzt. In diesem Fall wurde sowohl die NADH-Oxidation als auch die Oxidation von reduziertem Ferredoxin mit der Bildung von H<sub>2</sub> gekoppelt (**Abb. 29**).



**Abb. 29: Modell zur Funktion von Ech-Hydrogenase und NADH-abhängiger [FeFe]-Hydrogenase im Stoffwechsel von *Ta. tengcongensis* bei niedrigem  $p(H_2)$ .** Erläuterungen siehe Text. [NiFe]: Nickel-Eisen Zentrum, Ech: Ech-Hydrogenase, POR: Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Fd: Ferredoxin.

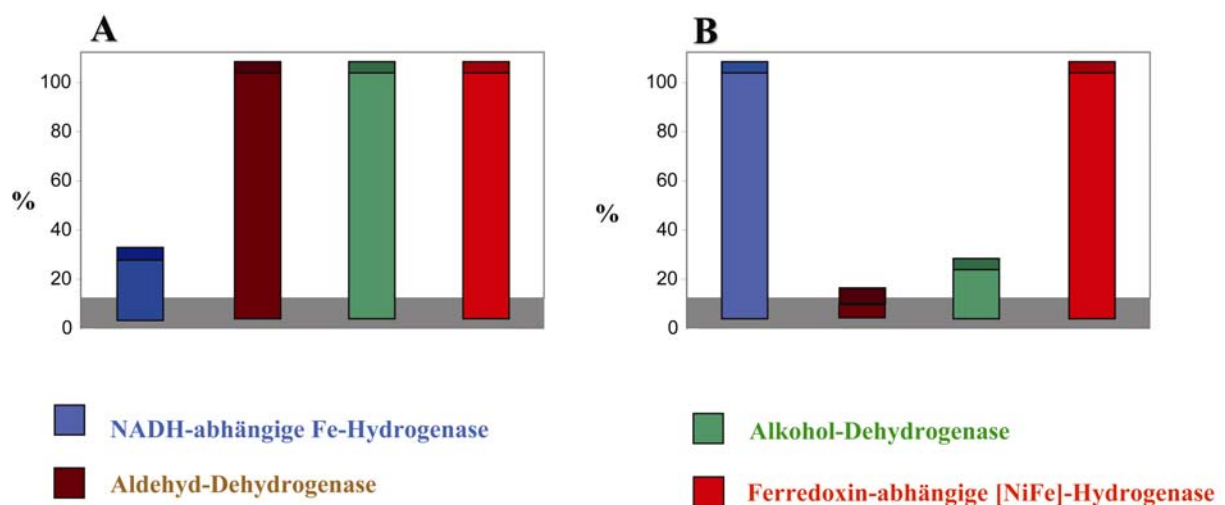
Bei einem  $p(\text{H}_2)$  von etwa  $10^{-4}$  atm und Glukose-, Acetat- und  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentrationen von jeweils  $\sim 10$  mM ist, ist der  $\Delta G'$  für die Umsetzung von Glukose zu 2 Acetat, 2  $\text{CO}_2$  und 4  $\text{H}_2$  etwa  $-329$  kJ (mol Glukose) $^{-1}$  bei 25 °C (Tewes & Thauer, 1980). Bei 70°C erhöht sich der  $\Delta G'$  auf  $-352$  kJ (mol Glukose) $^{-1}$  (Amend & Shock, 2001). Dieses würde für die Bildung von 5 mol ATP ausreichen, unter der Annahme, dass +70 kJ für die Synthese von ATP aus ADP und  $\text{P}_i$  bei physiologischen Konzentrationen und unter irreversible Bedingungen (Thauer et al., 1977) benötigt werden. Dieses ist deutlich mehr als 4 mol ATP, die durch Substrat-Stufen-Phosphorylierung erzeugt werden. Folglich erlauben die thermodynamischen Daten eine weitere Energiekonservierung in der Ech Hydrogenase Reaktion (siehe unten). In den Kulturen, die in geschlossenen Flaschen kultiviert wurden, in denen ein maximaler  $p(\text{H}_2)$  von etwa  $10^{-1}$  atm erreicht wurde, ist die Reaktion deutlich weniger exergon ( $\Delta G' = -284$  kJ mol $^{-1}$  bei 70°C). Folglich wird der Metabolismus in Richtung Ethanolanbildung verschoben, was zur Bildung von weniger ATP führt. Unter diesen Bedingungen ist reduziertes Ferredoxin die Hauptquelle für die Bildung von  $\text{H}_2$ , mehr als 50% der NADH-Oxidation ist unter diesen Bedingungen mit der Reduktion von Acetyl-CoA zu Ethanol gekoppelt (Abb. 30).



**Abb. 30: Modell zur Funktion der Enzyme, die an der  $\text{H}_2$ - und Ethanol-Bildung in *Ta. tengcongensis* bei hohem  $p(\text{H}_2)$  beteiligt sind.** Erläuterungen siehe Text. [NiFe]: Nickel-Eisen Zentrum, Ech: Ech-Hydrogenase, POR: Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Fd: Ferredoxin.



Diese Verschiebung im Metabolismus in Abhängigkeit vom  $p(\text{H}_2)$  deckt sich mit der Beobachtung, dass die NADH-abhängige Hydrogenase-Aktivität in Zellen, die bei hohem  $p(\text{H}_2)$  kultiviert wurden, niedriger war als in Zellen die bei permanent niedrigem  $p(\text{H}_2)$  kultiviert wurden. Alkohol-Dehydrogenase- und Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität hingegen war höher in Zellen, die bei hohem  $p(\text{H}_2)$  kultiviert wurden. Die Aktivität der Ferredoxin-abhängigen Hydrogenase war dagegen nahezu identisch unter beiden Wachstumsbedingungen (Tabelle 13) (**Abb. 31**).



**Abb. 31:** Spezifische Aktivitäten der Enzyme, die an der  $\text{H}_2$ - und Ethanol-Bildung in *Ta. tengcongensis* beteiligt sind. Zellextrakte wurden (A) aus in geschlossenen Flaschen gezogenen Kulturen (hoher  $p(\text{H}_2)$ ) oder (B) aus mit  $\text{N}_2$  begasteten Fermenter-Kulturen (niedriger  $p(\text{H}_2)$ ) hergestellt.

Diese Änderungen in den Aktivitäten der NADH-abhängigen Hydrogenase, der Alkohol-Dehydrogenase und der Aldehyd-Dehydrogenase zeigt, dass die Bildung dieser Enzyme entweder auf Transkriptions- oder Translationsebene reguliert wird oder, dass diese Enzyme direkt auf Protein-Ebene aktiviert bzw. inaktiviert werden. Das *Ta. tengcongensis* Genom wurde auf mögliche Regulorgene untersucht. Direkt stromaufwärts des Gens, das für die primäre Alkohol-Dehydrogenase kodiert (siehe unten), ist ein ORF (TTE0697), der für einen möglichen  $\text{H}_2$ -Sensor kodieren könnte. Die aminoternale Sequenz des abgeleiteten Proteins (Aminosäuren 1 - 320) zeigt Sequenzverwandtschaft mit der katalytischen Untereinheit der [FeFe]-Hydrogenasen, einschließlich der konservierten Cystein-Reste des H-Clusters und der Cystein-Reste für zwei [4Fe-4S]-Zentrum. Diese Hydrogenase-Domäne wird von einem ungefähr 90 Aminosäuren langen Bereich mit

einem hypothetischen Eisen-Schwefel-Zentrum-Bindemotiv (CX<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>16</sub>C) gefolgt. Dieser Sequenzbereich wiederum wird direkt von einer ungefähr 160 Aminosäuren-langen Sequenz (Aminosäure 420-581) gefolgt, mit Sequenzähnlichkeit zur PAS-Domäne verschiedener Proteine. Ein Multi-Sequenz-Alignement zeigt das Vorhandensein der hoch konservierten Aminosäure-Reste von PAS-Domänen, insbesondere die des PAS Kernes, in diesem Protein. PAS-Domänen wurden in einer großen Anzahl von sensorischen Proteinen identifiziert (Taylor & Zhulin, 1999). Der ORF TTE0697 überlappt mit 3 Bp mit dem ORF TTE0698, der für ein Protein von 393 Aminosäuren kodiert. Die aminotermiale Hälfte dieses Proteins (Aminosäure 1-160) zeigt Sequenzähnlichkeit mit der katalytischen Domäne der RsbU, RsbX und SpoIIE Phosphatasen, die Bestandteile der Phosphorylierung / Dephosphorylierungskaskade verschiedener Regulationssysteme sind (Adler et al., 1997). Man kann daher spekulieren, dass die beiden Proteine Teil eines H<sub>2</sub>-Sensor- und Kontrollsystems sind. Hierbei könnte es sich um ein alternatives System zu den sensorischen [NiFe]-Hydrogenasen handeln, die in Gram-negativen Bakterien gefunden wurden (Schwarz & Friedrich, 2003).

In dieser Arbeit wurden die an der Ethanol-Bildung beteiligten Enzyme von *Ta. tengcongensis* auf Zellextraktebene untersucht. In früheren Studien wurde jedoch die Ethanolbildung in *Thermoanaerobacter ethanolicus*, einer nah verwandten *Thermoanaerobacter*-Art, die vorwiegend Ethanol als Fermentationsprodukt bildet, untersucht. Aus diesem Organismus sind eine primäre- und eine sogenannte „sekundäre“ Alkohol-Dehydrogenase (ADH) gereinigt und charakterisiert worden (Burdette et al., 1996; Burdette & Zeikus, 1994). Beide Enzyme verwenden ein breites Spektrum von Alkoholen als Substrate, jedoch unterscheiden sich die Enzyme durch ihre Pyridinnukleotid- und Substrat-Spezifität. Während die sekundäre ADH spezifisch für NADP(H) ist, kann die primäre ADH beide Pyridinnukleotide benutzen. Die sekundäre ADH reduziert auch Isopropanol oder Butan-2-ol, die keine Substrate der primären ADH sind. Die sekundäre ADH katalysiert darüber hinaus die Reduktion von Acetyl-CoA zu Ethanol. Es handelt sich hierbei um eine bifunktionelle ADH-Acetyl-CoA-Thioesterase-Aktivität. Es wurde vorgeschlagen, dass dies die physiologische Reaktion ist, die *in vivo* durch das Enzym katalysiert wird. Eine *Ta. ethanolicus*-Mutante, die keine funktionelle primäre Alkohol-Dehydrogenase mehr besitzt, war immer noch in der Lage, während der Fermentation Ethanol zu produzieren, was darauf hindeutet, dass die sekundäre ADH für die Ethanolproduktion verantwortlich ist (Burdette et al., 2002).



Das *Ta. tengcongensis*-Genom enthält einen ORF (TTE0695), der für ein Protein mit 96% Sequenzidentität zur sekundären ADH vom *Ta. ethanolicus* kodiert. *Ta. tengcongensis* enthält auch einen ORF (TTE0696), der für ein Protein mit 91% Sequenzidentität zur primären ADH von *Ta. ethanolicus* kodiert. Das Aktivitätsspektrum, das in Zellextrakten von *Ta. tengcongensis* gemessen wurde (Tabelle 13), deutet darauf hin, dass beide ADHs auch in *Ta. tengcongensis* gebildet werden. Obwohl Zellextrakte von *Ta. tengcongensis* hohe Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten besitzen, kodiert das Genom für keine der bislang charakterisierten Aldehyd-Dehydrogenasen. Die sekundäre ADH von *Ta. tengcongensis* zeigt eine hohe Sequenzidentität zu dem entsprechenden Enzym vom *Ta. ethanolicus*. Es wird daher vermutet, dass das Enzym aus *Ta. tengcongensis* ebenfalls bifunktional ist. Ein Punkt, der in der zukünftigen Untersuchungen geklärt werden muss ist, wie NADH, das in der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Reaktion erzeugt wird, in NADPH umgewandelt wird. Denn während die bifunktionelle ALDH/ADH NADP(H)-spezifisch ist, ist die Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus *Ta. tengcongensis* NAD<sup>+</sup>-spezifisch (Daten nicht gezeigt).

## 5. Energiekonvertierende [NiFe]-Hydrogenasen

Wie in der Einleitung zu dieser Arbeit bereits beschrieben, konnte in den vergangenen Jahren eine kleine Gruppe membrangebundener [NiFe]-Hydrogenasen identifiziert werden, die eine enge Sequenzverwandtschaft zu Komplex I besitzen (Hedderich, 2003). Der bislang einzige Vertreter dieser Gruppe von Hydrogenasen, der gereinigt und somit auch biochemisch charakterisiert werden konnte, war Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri*. In dieser Arbeit gelang die Reinigung zweier weiterer Mitglieder dieser Hydrogenase Familie. Das Enzym aus *Ta. tengcongensis* zeigt die höchste Sequenzverwandtschaft zu dem *Ms. Barkeri*-Enzym und wurde daher ebenfalls als Ech-Hydrogenase bezeichnet. Die Hydrogenase aus *Ca. hydrogenoformans*, die mit beiden Enzymen eng verwandt ist, konnte hingegen nur im Komplex mit einer CO-Dehydrogenase gereinigt werden. Für dieses Enzym wurde die bereits bestehende Nomenklatur des Enzyms aus *R. rubrum* übernommen. In *R. rubrum* werden Hydrogenase und CO-Dehydrogenase nur bei anaerobem Wachstum mit CO gebildet (Kerby et al., 1992), daher die Bezeichnung der Gene als „*coo*“. Als eine wesentliche katalytische Eigenschaft dieser Enzyme kristallisiert sich ihre Fähigkeit Ferredoxine als Substrat zu verwerten, heraus. Eine wesentliche

Funktion des Enzyms aus *Ms. barkeri* ist es, die Zelle mit reduziertem Ferredoxin zu versorgen (Meuer et al., 2002), während die Enzyme aus *Ca. hydrogenoformans* und *Ta. tengcongensis* die Bildung von  $H_2$  mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonoren katalysieren. Das *Ca. hydrogenoformans*-Enzym reagiert im Unterschied zu den beiden anderen Enzymen nicht mit freiem Ferredoxin. Vielmehr kann hier die Untereinheit CooF des Enzymkomplexes als Polyferredoxin angesehen werden.

Aufgrund der Sequenzverwandtschaft zu Komplex I wurde postuliert, dass es sich bei diesen Hydrogenasen ebenfalls um Ionenpumpen handeln könnte. Obwohl ein direkter Nachweis der Energiekopplung für diese Hydrogenase noch aussteht, liefern die physiologischen Untersuchungen an Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* (siehe Einleitung) und an dem CO-oxidierenden: $H_2$ -bildenden Enzymkomplex aus *Ca. hydrogenoformans* gute Hinweise für die Existenz einer solchen Kopplung. Da *Ca. hydrogenoformans* mit CO als alleinigem Energiesubstrat wächst, muss in diesem Organismus die Umsetzung von CO zu  $CO_2$  und  $H_2$  mit Energiekonservierung gekoppelt sein. Es wird angenommen, dass die Hydrogenase in dem Enzymkomplex ähnlich wie Komplex I als Ionenpumpe fungiert. Messungen der Protonentranslokation in ganzen Zellen haben ergeben, dass pro mol CO, das zu  $CO_2$  und  $H_2$  umgesetzt wird, etwa 1,5 mol  $H^+$  über die Cytoplasmamembran transloziert werden (Daten nicht gezeigt). Ob der Enzymkomplex hierbei als primäre Protonenpumpe fungiert oder ob primär ein Natrium-Ionengradient aufgebaut wird, der über sekundäre Prozesse zu einem Protonengradienten führt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Auch für Ech-Hydrogenase aus dem fermentierenden Bakterium *Ta. tengcongensis* wird eine solche energiekonservierende Funktion angenommen. Die oben gemachten thermodynamischen Betrachtungen lassen eine solche zusätzliche Energiekonservierung zumindest aus thermodynamischer Sicht zu. Wie die Untersuchungen mit invertierten Membranvesikeln von *P. furiosus* gezeigt haben, findet eine solche Energiekopplung in diesem Organismus auch tatsächlich statt (Sapra et al., 2003). Die Rolle des *Ms. barkeri*-Enzyms besteht hauptsächlich darin, die Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  durch revertierten Elektronentransport zu katalysieren. Die beiden übrigen Enzyme hingegen koppeln die  $H_2$ -Bildung mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonoren mit Energiekonservierung. Hier fungieren  $H^+$  als Elektronenakzeptoren einer Atmungskette, ein Prozess der auch als Protonenrespiration bezeichnet werden kann. Daher die allgemeine Bezeichnung der Enzyme als Energiekonvertierende [NiFe]-Hydrogenasen (Ech = energy converting hydrogenase).

Für die Diskussion eines möglichen Kopplungsmechanismus sollen zunächst die am Elektronentransfer beteiligten prosthetischen Gruppen näher beschrieben werden. Energie-konvertierende [NiFe]-Hydrogenasen tragen neben dem [NiFe]-Zentrum drei Bindemotive für [4Fe-4S]-Zentren. Eines dieser Eisen-Schwefel-Zentren ist das in allen [NiFe]-Hydrogenasen konservierte proximale Cluster, das unmittelbar mit dem [NiFe]-Zentrum wechselwirkt. Die beiden übrigen Eisen-Schwefel-Zentren sind in einer separaten Untereinheit lokalisiert. Metallanalysen gereinigter Ech-Hydrogenase bestätigen das Vorhandensein von drei [4Fe-4S]-Zentren pro [NiFe]-Zentrum. Mittels EPR-Spektroskopie konnten drei unterschiedliche Eisen-Schwefel-Zentren detektiert werden (Kurkin et al., 2002). Wie in allen [NiFe]-Hydrogenasen erfolgt auch in Ech-Hydrogenase die H<sub>2</sub>-Bildung bzw. -Aktivierung am [NiFe]-Zentrum unter Beteiligung des proximalen [4Fe-4S]-Zentrums. Das in Ech-Hydrogenase und den anderen Mitgliedern dieser Hydrogenase-Familie zusätzlich vorhandene [Fe-S]-Protein (EchF in Ech-Hydrogenase) übernimmt damit höchstwahrscheinlich den Elektronentransfer zum physiologischen Elektronendonator bzw. -akzeptor, der im Fall von Ech-Hydrogenase ein 2-[4Fe-4S]-Ferredoxin darstellt. Der exergone Elektronentransfer von Ferredoxin über die [Fe-S]-Zentren zum [NiFe]-Zentrum sollte mit Energiekonservierung gekoppelt sein und somit die Energiekopplungsstelle beinhalten. Es gibt keine Hinweise auf weitere prosthetische Gruppen im Membranteil von Ech-Hydrogenase, was gegen eine Beteiligung dieser Untereinheiten am Elektronentransfer spricht. Insbesondere eine Beteiligung von Chinonen bzw. des in *Methanosarcina*-Species identifizierten Methanophenazins am Elektronentransfer scheint wenig wahrscheinlich, zumal diese Elektronenüberträger in einigen Organismen mit Energie-konvertierenden [NiFe]-Hydrogenasen nicht vorkommen, beispielsweise in *Methanothermobacter marburgensis* (U. Deppenmeier, persönliche Mitteilung). Auch konnten in Clostridien keine Chinone detektiert werden (Hess et al., 1979). Es kann daher angenommen werden, dass die zu Clostridien eng verwandten *Thermoanaerobacter*-Arten ebenso über keine Chinone verfügen. Es wird diskutiert, ob die in Komplex I und den membrangebundenen Hydrogenasen konservierten Untereinheiten ein Modul bilden, das eine exergone Redoxreaktion mit dem Aufbau eines elektrochemischen Ionengradienten koppelt (Albracht & Hedderich, 2000). Die Mehrzahl der für Komplex I vorgeschlagenen Mechanismen gehen entweder von einem Q-Zyklus oder einem Redox-getriebenen Ionenpumpmechanismus aus (Hirst, 2003). Aufgrund der oben gemachten Betrachtungen scheidet ein „Q-Zyklus“ als Kopplungsmechanismus für die membrangebundenen Hydrogenasen aus. In Komplex I wird eine Beteiligung eines Eisen-Schwefel-Zentrums,

des sogenannten Clusters N2, an der Energiekopplung diskutiert. Das Mittelpunktpotential dieses Clusters ist pH-abhängig, was daraufhin deutet, dass eine Redox-Bohr-Gruppe mit diesem Cluster assoziiert vorliegt (Ingledew & Ohnishi, 1980). Die Charakterisierung von Ech-Hydrogenase mittels EPR-Spektroskopie führte zur Identifizierung eines Eisen-Schwefel-Zentrums mit ähnlichen *g*-Werten und Redoxeigenschaften wie Cluster N2 (Kurkin et al., 2002). Eine Beteiligung dieses Eisen-Schwefel-Zentrums an der Energiekopplung müssen zukünftige Experimente zeigen.

## VI LITERATUR

- Adams, M. W. (1990).** The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 115-1145.
- Adler, E., Donella-Deana, A., Arigoni, F., Pinna, L. A. & Stragler, P. (1997).** Structural relationship between a bacterial developmental protein and eukaryotic PP2C protein phosphatases. *Mol. Microbiol.* **23**, 57-62.
- Afting, C., Hochheimer, A. & Thauer, R. K. (1998).** Function of H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F<sub>420</sub> reduction with H<sub>2</sub>. *Arch. Microbiol.* **169**, 206-210.
- Akhmanova, A., Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M. & Hackstein, J. H. (1998).** A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**, 527-538.
- Albracht, S. P. & Hedderich, R. (2000).** Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *FEBS Lett.* **485**, 1-6.
- Amend, J. P. & Shock, E. L. (2001).** Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 175-243.
- Andrews, S. C., Berks, B. C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P. & Guest, J. R. (1997).** A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* **143**, 3633-3647.
- Axley, M. J., Grahame, D. A. & Stadtman, T. C. (1990).** *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J. Biol. Chem.* **265**, 18213-18218.
- Bao, Q., Tian, Y., Li, W., Xu, Z., Xuan, Z., Hu, S., Dong, W., Yang, J., Chen, Y., Xue, Y., Xu, Y., Lai, X., Huang, L., Dong, X., Ma, Y., Ling, L., Tan, H., Chen, R., Wang, J., Yu, J. & Yang, H. (2002).** A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res.* **12**, 689-700.
- Beinert, H. & Albracht, S. P. (1982).** New insights, ideas and unanswered questions concerning iron-sulfur clusters in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **683**, 245-277.
- Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S. & Böck, A. (2002).** Metal insertion into Ni[FeFe]-Hydrogenases. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 674-680.
- Böhm, R., Sauter, M. & Böck, A. (1990).** Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol. Microbiol.* **4**, 231-243.

- Boiangiu, C., Hermann, G. & Buckel, W. (2004).** NADH:ferredoxin oxidoreductase from clostridia involved in energy conservation. Poster Beitrag *VAAM-Jahrestagung*. Braunschweig.
- Bonam, D. & Ludden, P. W. (1987).** Purification and characterization of carbon monoxide dehydrogenase, a nickel, zinc, iron-sulfur protein, from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **262**, 2980-7987.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Burdette, D. S., Jung, S. H., Shen, G. J., Hollingsworth, R. I. & Zeikus, J. G. (2002).** Physiological function of alcohol dehydrogenases and long-chain (C-30) fatty acids in alcohol tolerance of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1914-1918.
- Burdette, D. S., Vieille, C. & Zeikus, J. G. (1996).** Cloning and expression of the gene encoding the *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39e secondary-alcohol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **316**, 115-122.
- Burdette, D. S. & Zeikus, J. G. (1994).** Purification of acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39e and characterisation of the secondary-alcohol dehydrogenase as a bifunctional alcohol dehydrogenase-acetyl-CoA reductive thioesterase. *Biochem. J.* **302**, 163-170.
- Buurman, G., Shima, S. & Thauer, R. K. (2000).** The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett.* **485**, 200-214.
- Cammack, R. (1999).** Hydrogenase sophistication. *Nature* **397**, 214-225.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. & Harrison, P. R. (1986).** The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.* **5**, 1221-1227.
- Chen, J.-S. & Blanchard, D. K. (1979).** A simple hydrogenase-linked assay for ferredoxin and flavodoxin. *Anal. Biochem.* **93**, 216-222.
- Cline, J. D. (1969).** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. *Limnol. Oceanogr.* **14**, 454-458.
- De Luca, G., Asso, M., Belaich, J. P. & Dermoun, Z. (1998).** Purification and characterization of the HndA subunit of NADP-reducing hydrogenase from *Desulfovibrio fructosovorans* overproduced in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 2660-2665.
- Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R. & Meyer, O. (2001).** Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* **293**, 1281-1295.

- Dorn, M., Andreesen, J. R. & Gottschalk, G. (1978).** Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *J. Bacteriol.* **133**, 26-32.
- Drapal, N. & Böck, A. (1998).** Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. *Biochemistry* **37**, 2941-2948.
- Drennan, C. L., Heo, J., Sintchak, M. D., Schreiter, E. & Ludden, P. W. (2001).** Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 11973-11988.
- Ensign, S. A., Hyman, M. R. & Ludden, P. W. (1989).** Nickel-specific, slow-binding inhibition of carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by cyanide. *Biochemistry* **28**, 4973-4979.
- Ensign, S. A. & Ludden, P. W. (1991).** Characterization of the CO oxidation/H<sub>2</sub> evolution system of *Rhodospirillum rubrum*. Role of a 22-kDa iron-sulfur protein in mediating electron transfer between carbon monoxide dehydrogenase and hydrogenase. *J. Biol. Chem.* **266**, 18395-18403.
- Fish, W. W. (1988).** Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol.* **158**, 357-364.
- Forzi, L. (2001).** Probing the proton pumping funktion of *Escherichia coli* hydrogenase 3, an enzyme related to energy conserving NADH:quinone oxidoreductase. Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg.
- Fox, J. D., He, Y., Shelver, D., Roberts, G. P. & Ludden, P. W. (1996).** Characterization of the region encoding the CO-induced hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **178**, 6200-6208.
- Fox, J. D., Kerby, R. L., Roberts, G. P. & Ludden, P. W. (1996).** Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J. Bacteriol.* **178**, 1515-1524.
- Frey, M. (1998).** Structural and functional properties. In *Metal Sites in Proteins and Models*, pp. 97-126. Berlin: Springer-Verlag.
- Friedrich, T. & Scheide, D. (2000).** The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.* **479**, 1-5.
- Friedrich, B. & Schwartz, E. (1993).** Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 351-383.
- Garcin, E., Montet, Y., Volbeda, A., Hatchikian, C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (1998).** Structural bases for the catalytic mechanism of [NiFe] hydrogenases. *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 396-401.

**Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (1999).** The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure Fold. Des.* **7**, 557-566.

**Graf, E. G. & Thauer, R. K. (1981).** Hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, a nickel-containing enzyme. *FEBS Lett.* **136**, 165-169.

**Happe, R. P., Roseboom, W., Pierik, A. J., Albracht, S. P. & Bagley, K. A. (1997).** Biological activation of hydrogen. *Nature* **385**, 126-131

**Happe, T., Mosler, B. & Naber, J. D. (1994).** Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* **222**, 769-774.

**He, Y., Shelver, D., Kerby, R. L. & Roberts, G. P. (1996).** Characterization of a CO-responsive transcriptional activator from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **271**, 120-133.

**Hedderich, R. (2003).** Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I? *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 65-75.

**Heo, J., Halbleib, C. M. & Ludden, P. W. (2001).** Redox-dependent activation of CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 7690-7693.

**Hess, A., Hollander, R. & Mannheim, W. (1979).** Lipoquinones of some spore-forming rods, lactic-acid bacteria and actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **115**, 247-252.

**Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. & Dreyer, W. J. (1981).** A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* **256**, 7990-7997.

**Hirst, J. (2003).** The dichotomy of complex I: a sodium ion pump or a proton pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 773-775.

**Holtz, C., Kaspari, H. & Klemme, J. H. (1991).** Production and properties of xylanases from thermophilic actinomycetes. *A. v. Leeuwenhoek* **59**, 1-7.

**Ingledeu, W. J. & Ohnishi, T. (1980).** An analysis of some thermodynamic properties of iron-sulphur centres in site I of mitochondria. *Biochem. J.* **186**, 111-117.

**Jungermann, K., Thauer, R. K., Leimenstoll, G. & Decker, K. (1973).** Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductase in saccharolytic clostridia. *Biochem. Biophys. Acta* **305**, 268-280.

**Kaesler, B. & Schönheit, P. (1989).** The role of sodium ions in methanogenesis. Formaldehyde oxidation to CO<sub>2</sub> and 2H<sub>2</sub> in methanogenic bacteria is coupled with primary electrogenic Na<sup>+</sup> translocation at a stoichiometry of 2-3 Na<sup>+</sup>/CO<sub>2</sub>. *Eur. J. Biochem.* **184**, 223-232.

**Kaesler, B. & Schönheit, P. (1989).** The sodium cycle in methanogenesis. CO<sub>2</sub> reduction to the formaldehyde level in methanogenic bacteria is driven by a primary electrochemical



potential of Na<sup>+</sup> generated by formaldehyde reduction to CH<sub>4</sub>. *Eur. J. Biochem.* **186**, 309-316.

**Kerby, R. L., Hong, S. S., Ensign, S. A., Coppoc, L. J., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (1992).** Genetic and physiological characterization of the *Rhodospirillum rubrum* carbon monoxide dehydrogenase system. *J. Bacteriol.* **174**, 5284-5294.

**Kerby, R. L., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (1997).** *In vivo* nickel insertion into the carbon monoxide dehydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*: molecular and physiological characterization of *cooCTJ*. *J. Bacteriol.* **179**, 2259-2266.

**Künkkel, A., Vorholt, J. A., Thauer, R. K. & Hedderich, R. (1998).** An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* **252**, 467-476.

**Kurkin, S., Meuer, J., Koch, J., Hedderich, R. & Albracht, S. P. (2002).** The membrane-bound [NiFe]-hydrogenase (Ech) from *Methanosarcina barkeri*: unusual properties of the iron-sulphur clusters. *Eur. J. Biochem.* **269**, 6101-6111.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

**Lyon, E. J., Shima, S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K. & Thauer, R. K. (2004).** UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* **271**, 195-204.

**Maier, T., Binder, U. & Böck, A. (1996).** Analysis of the *hydA* locus of *Escherichia coli* - two genes (*hydN* and *hypF*) involved in formate and hydrogen metabolism. *Arch. Microbiol.* **165**, 333-341.

**Malki, S., Saimmaime, I., De Luca, G., Rousset, M., Dermoun, Z. & Belaich, J. P. (1995).** Characterization of an operon encoding an NADP-reducing hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans*. *J. Bacteriol.* **177**, 2628-2636.

**Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Künkkel, A. & Hedderich, R. (1999).** Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **265**, 325-335.

**Meuer, J., Kuettner, H. C., Zhang, J. K., Hedderich, R. & Metcalf, W. W. (2002).** Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5632-5637.

**Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E. & Fontecilla-Camps, J. C. (1999).** *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Struct. Fold. Des.* **7**, 13-23.

**Pan, G., Menon, A. L. & Adams, M. W. (2003).** Characterization of a [2Fe-2S] protein encoded in the iron-hydrogenase operon of *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 469-474.

- Payne, M. J., Chapman, A. & Cammack, R. (1993).** Evidence for an [Fe]-type hydrogenase in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* **317**, 101-104.
- Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J. & Seefeldt, L. C. (1998).** X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**, 1853-1858.
- Pierik, A. J., Hulstein, M., Hagen, W. R. & Albracht, S. P. (1998).** A low-spin iron with CN<sup>-</sup> and CO as intrinsic ligands forms the core of the active site in [Fe]-hydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **258**, 572-578.
- Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A. & Albracht, S. P. (1999).** Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)<sub>2</sub>CO, Biology's way to activate H<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **274**, 3331-3337.
- Pierik, A. J., Schmelz, M., Lenz, O., Friedrich, B. & Albracht, S. P. J. (1998).** Characterization of the active site of a hydrogen sensor from *Alcaligenes eutrophus*. *FEBS Lett.* **438**, 231-235.
- Przybyla, A. E., Robbins, J., Menon, N. & Peck, H. D., Jr. (1992).** Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* **8**, 109-135.
- Puttner, I., Solioz, M., Carafoli, E. & Ludwig, B. (1983).** Dicyclohexylcarbodiimide does not inhibit proton pumping by cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **134**, 33-37.
- Rieder, R., Cammack, R. & Hall, D. O. (1984).** Purification and properties of the soluble hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* (strain Norway 4). *Eur. J. Biochem.* **145**, 637-643.
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F. & Bock, A. (1994).** Maturation of the large subunit (HYCE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur. J. Biochem.* **220**, 377-384.
- Sapra, R., Bagramyan, K. & Adams, M. W. (2003).** A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 7545-7550.
- Sapra, R., Verhagen, M. F. & Adams, M. W. (2000).** Purification and characterization of a membrane-bound hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **182**, 3423-3428.
- Sauter, M., Böhm, R. & Böck, A. (1992).** Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 1523-1532.
- Sawers, G. (1994).** The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *A. v. Leeuwenhoek* **66**, 57-88.

**Schröder, C., Selig, M. & Schönheit, P. (1994).** Glucose fermentation to acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*: involvement of the Emden-Meyerhof pathway. *Arch. Microbiol.* **161**, 460-470.

**Schwarz, E. & Friedrich, B. (2003).** The H<sub>2</sub>-metabolizing prokaryotes. In *The prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community* (<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>). Edited by M. Dworkin et al. New York: Springer.

**Segelke, B. W. (2001).** Efficiency analysis of sampling protocols used in protein crystallization screening. *J. Cryst. Growth* **232**, 553-562.

**Silva, P. J., van den Ban, E. C., Wassink, H., Haaker, H., de Castro, B., Robb, F. T. & Hagen, W. R. (2000).** Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6541-6551.

**Soboh, B. (2001).** Reinigung und Charakterisierung eines CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus der Membranfraktion von *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. Diplomarbeit Philipps-Universität. Marburg.

**Sorgenfrei, O., Duin, E. C., Klein, A. & Albracht, S. P. J. (1996).** Interactions of <sup>77</sup>Se and <sup>13</sup>CO with nickel in the active site of active F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase from *Methanococcus voltae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 23799-23806.

**Stein, M. & Lubitz, W. (2002).** Quantum chemical calculations of [NiFe] hydrogenase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 243-249.

**Steuber, J. (2001).** Na<sup>+</sup> translocation by bacterial NADH:quinone oxidoreductases: an extension to the complex-I family of primary redox pumps. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 45-56.

**Svetlichny, V. A., Sokolova, T. G., Gerhardt, M., Kostrikina, N. A. & Zavarzin, G. A. (1991).** Anaerobic extremely thermophilic carboxydophilic bacteria in hydrotherms of Kuril islands. *Microbial Ecology* **21**, 1-10.

**Svetlichny, V. A., Sokolova, T. G., Gerhardt, M., Ringpfeil, M., Kostrikina, N. A. & Zavarzin, G. A. (1991).** *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing thermophilic anaerobic bacterium from hypothermal environments of Kunashir island. *System. Appl. Microbiol.* **14**, 254-260.

**Svetlichnyi, V., Peschel, C., Acker, G. & Meyer, O. (2001).** Two membrane-associated NiFeS-carbon monoxide dehydrogenases from the anaerobic carbon-monoxide-utilizing eubacterium *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *J. Bacteriol.* **183**, 5134-5144.

**Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999).** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 479-506.

**Teixeira, M., Fauque, G., Moura, I., Lespinat, P. A., Berlier, Y., Prickril, B., Peck, H. D., Jr., Xavier, A. V., Le Gall, J. & Moura, J. J. (1987).** Nickel-[iron-sulfur]-selenium-

containing hydrogenases from *Desulfovibrio baculatus* (DSM 1743). Redox centers and catalytic properties. *Eur. J. Biochem.* **167**, 47-58.

**Teixeira, M., Moura, I., Fauque, G., Czechowski, M., Berlier, Y., Lespinat, P. A., Le Gall, J., Xavier, A. V. & Moura, J. J. (1986).** Redox properties and activity studies on a nickel-containing hydrogenase isolated from a halophilic sulfate reducer *Desulfovibrio salexigens*. *Biochimie* **68**, 75-84.

**Teixeira, M., Moura, I., Fauque, G., Dervartanian, D. V., Legall, J., Peck, H. D., Jr., Moura, J. J. & Huynh, B. H. (1990).** The iron-sulfur centers of the soluble [NiFeSe] hydrogenase, from *Desulfovibrio baculatus* (DSM 1743). EPR and Mössbauer characterization. *Eur. J. Biochem.* **189**, 381-386.

**Terlesky, K. C. & Ferry, J. G. (1988).** Purification and characterization of a ferredoxin from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Biol. Chem.* **263**, 4080-4092.

**Tersteegen, A. & Hedderich, R. (1999).** *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multi-subunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. Transcription of the operons and sequence analysis of the deduced proteins. *Eur. J. Biochem.* **264**, 930-943.

**Tewes, F. J. & Thauer, R. K. (1980).** Regulation of ATP-synthesis in glucose fermenting bacteria involved in interspecies hydrogen transfer. In *Anaerobes and anaerobic infections*, pp. 97-104. Edited by G. Gottschalk. Stuttgart & New York: Gustav Fischer Verlag.

**Thauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977).** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bact. Rev.* **41**, 100-180.

**Thauer, R. K., Klein, A. R. & Hartmann, G. C. (1996).** Reactions with molecular hydrogen in microorganisms. Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. *Chem. Rev.* **96**, 3031-3042.

**Uffen, R. L. (1976).** Anaerobic growth of a *Rhodopseudomonas* species in the dark with carbon monoxide as sole carbon and energy substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **73**, 3298-3302.

**Uffen, R. L. (1983).** Metabolism of carbon monoxide by *Rhodopseudomonas gelatinosa*: Cell growth and properties of the oxidation system. *J. Bacteriol.* **155**, 956-965.

**van Montfort, B. A., Doeven, M. K., Canas, B., Veenhoff, L. M., Poolman, B. & Robillard, G. T. (2002).** Combined in-gel tryptic digestion and CNBr cleavage for the generation of peptide maps of an integral membrane protein with MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**, 111-115.

**van Niel, E. W., Claassen, P. A. & Stams, A. J. (2003).** Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 255-262.

**Verhagen, M. F., O'Rourke, T. & Adams, M. W. (1999).** The hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*, contains an unusually complex iron-hydrogenase: amino

acid sequence analyses versus biochemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **1412**, 212-229.

**Verhagen, M. F., O'Rourke, T. W., Menon, A. L. & Adams, M. W. (2001).** Heterologous expression and properties of the gamma-subunit of the Fe-only hydrogenase from *Thermotoga maritima*. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 209-219.

**Vignais, P. M., Billoud, B. & Meyer, J. (2001).** Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 455-501.

**Villasenor, A., Sha, M., Thana, P. & Browner, M. (2002).** Fast drops: a high-throughput approach for setting up protein crystal screens. *Biotechniques* **32**, 184, 186, 188-199.

**Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (1995).** Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580-587.

**Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C. & Frey, M. (1996).** Novel metal sites in protein structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 804-812.

**Walsh, C. T., Schonbrunn, A., Lockridge, O., Massey, V. & Abeles, R. H. (1972).** Inactivation of a flavoprotein, lactate oxidase, by an acetylenic substrate. *J. Biol. Chem.* **247**, 6004-6006.

**Wang, J., Xue, Y., Feng, X., Li, X., Wang, H., Li, W., Zhao, C., Cheng, X., Ma, Y., Zhou, P., Yin, J., Bhatnagar, A., Wang, R. & Liu, S. (2004).** An analysis of the proteomic profile for *Thermoanaerobacter tengcongensis* under optimal culture conditions. *Proteomics* **4**, 136-150.

**Watt, R. K. & Ludden, P. W. (1998).** The identification, purification, and characterization of CooJ. A nickel-binding protein that is co-regulated with the Ni-containing CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **273**, 10019-10025.

**Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H. & Weiss, H. (1993).** The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J. Mol. Biol.* **233**, 109-122.

**West, A. H. & Stock, A. M. (2001).** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369-376.

**Winner, C. & Gottschalk, G. (1989).** H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> production from methanol or formaldehyde by the methanogenic strain Gö1 treated with 2-bromoethanesulfonic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**, 259-264.

**Winter, R. N., F. (1998).** *Methoden der biophysikalischen Chemie*. Stuttgart: Teubner.

**Wu, L.-F. & Mandrand, M. A. (1993).** Microbial hydrogenases: Primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**, 243-270.

**Xue, Y., Xu, Y., Liu, Y., Ma, Y. & Zhou, P. (2001).** *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1335-13341.

**Yagi, T. & Hatefi, Y. (1988).** Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-binding subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J. Biol. Chem.* **263**, 16150-16155.

**Yamazaki, S. (1982).** A selenium-containing hydrogenase from *Methanococcus vannielii*. Identification of the selenium moiety as a selenocysteine residue. *J. Biol. Chem.* **257**, 7926-7929.

## DANK

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. R. Hedderich für die Überlassung dieses äußerst interessanten Themas, für seine Anregungen, ständige Diskussionsbereitschaft und für die intensive Betreuung.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer für die intensive Unterstützung während meines Studiums und während der Durchführung dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich Ihnen dafür danken, dass diese Unterstützung auch über Studienangelegenheiten hinausging.

Prof. Dr. W. Buckel, Prof. Dr. M. Marahiel, und Prof. Dr. A. Batschauer danke ich für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Dr. Antonio Pierik und Dr. Gerd Mander bedanke ich mich recht herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der EPR-spektroskopischen Analysen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Prof. Thauer, Dr. Shima und Dr. Hedderich danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit.

Viele große Kleinigkeiten, die die Arbeit im Labor und das drum herum erleichtern, haben Jürgen Koch, Reinhard Böcher, Dr. Manfred Irmeler, Jörg Kahnt sowie Dr. Astrid Brandis-Heep und Monika Schmidt erledigt. Herzlichen Dank hierfür.

Meinen Kollegen im „Labor 3-Team“ Nils Hamann, Lucia Forzi und Dr. Alexander Stojanowic danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Der Dank geht ebenso an die Kollegen Dr. Christoph Hagemeyer, Dr. Markus Krüer, Dr. Erika Lyon, Bärbel Buchenau, Meike Goenrich, Dr. Markus Laukel, Stefan Aufhammer und Henning Seedorf für die gute Laune, die sie an mich weitergegeben haben.

Dem World University Service (WUS), der Max-Planck-Gesellschaft sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde, möchte ich ebenfalls danken.

Darüber hinaus gilt mein besondere Dank natürlich meiner Frau Julia und meiner Familie, die mich während der ganzen Zeit seelisch unterstützt haben.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name:	Basem Soboh
Geburtsdatum:	16.09.1974
Geburtsort:	Gaza/Palästina
Familienstand:	seit 08/2003 verheiratet mit Julia Hahner

### Schul Ausbildung

1980-1986	Grundschule in Gaza
1986-1989	Mittelschule in Gaza
1989-1992	Secondary School (Gymnasium) in Gaza
Juni 1992	Abitur

### Hochschulausbildung

Sept. 1992-Juni 1996	Studium der Mikrobiologie/Chemie an der Al-Azhar-Universität Gaza
Aug. 1996	Bachelor of Science
10/1996-1997	Deutsch Sprachkurs in Marburg
10/1997	Anerkennung des „Bachelor of Science“ als Vordiplom
10/1997-2000	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
04/2000	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Virologie
05/2000-05/2001	Anfertigung der Diplomarbeit im Max-Plank-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von PD Dr. R. Hedderich mit dem Thema „Reinigung und Charakterisierung eines CO-oxidierenden/H <sub>2</sub> -bildenden Enzymkomplexes aus der Membranfraktion von <i>Carboxydotherrnus hydrogenoforrnans</i> “
05/2001-05/2004	Anfertigung der Dissertation im Max-Plank-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von PD Dr. R. Hedderich



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Zu Komplex I verwandte Hydrogenasen in  
*Carboxydotherrnus hydrogenofornans* und  
*Thermoanaerobacter tengcongensis***

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)